

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/097405 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 21/55,**  
21/21

**GMBH [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, 55129 Mainz (DE).**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/05895**

(72) **Erfinder; und**  
(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): WESTPHAL, Peter [DE/DE]; Kritzgraben 6, 07743 Jena (DE). EBERHARDT, Matthias [DE/DE]; Kelternweg 183, 89075 Ulm (DE).**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Mai 2002 (29.05.2002)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(74) **Anwälte: FUCHS, Jürgen, H. usw.; Abraham-Lincoln-Strasse 7, 65189 Wiesbaden (DE).**

(30) Angaben zur Priorität:  
101 26 152.7 30. Mai 2001 (30.05.2001) **DE**

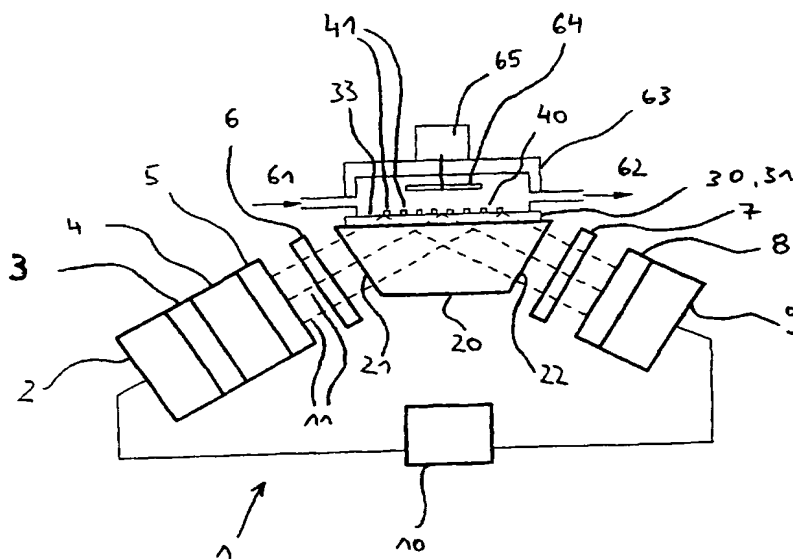
(81) **Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,**

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** HIGH-RESOLUTION ELLIPSOMETRY METHOD FOR QUANTITATIVE OR QUALITATIVE ANALYSIS OF SAMPLE VARIATIONS, BIOCHIP AND MEASURING DEVICE

(54) **Bezeichnung:** ORTSAUFGEÖSTES ELLIPSOMETRIE-VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN UND/ODER QUALITATIVEN BESTIMMUNG VON PROBENÄNDERUNGEN, BIOCHIP UND MESSANORDNUNG



(57) **Abstract:** This invention relates to a high-resolution ellipsometry method for quantitative and/or qualitative analysis of sample variations. The sample is located on a sample carrier, equipped with at least one metal film. The parameters  $\Psi$  and  $\Delta$  are determined by ellipsometric measurement, wherein the angle of incidence and/or frequency of the electromagnetic radiation used in ellipsometric measurements is set in such a way as to produce a damped surface plasmon resonance. The detection sensitivity (sample variation unit) is adjusted by means of the thickness of the metal layer. The electromagnetic radiation is planely radiated onto the side of the sample carrier opposite the sample. Using at least one angle of incidence and one frequency at least two staggered, simultaneous, high-resolution ellipsometric measurements are taken of

the sample or samples. At least the corresponding  $\Delta$  or  $\cos \Delta$  value are evaluated to determine sample variation. The invention also relates to a biochip having a base plate with at least one metal layer and a measuring device having an ellipsometre with a radiation source (2), a polarizer (6), an analyzer (7) and a detector (9), which is an image-providing sensor. A lens system (5, 8) is arranged in the beam path, behind and in front of the biochip coupling and decoupling device (20), which planely illuminates said coupling and decoupling device and the detecting surface of the detector (9). The invention further relates to an evaluation unit (10) that carries out simultaneous high-resolution processing of the measurement signals and at least for simultaneous high-resolution evaluation of the values  $\delta \cos \Delta$ .

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/097405 A2



LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Es wird ein orts aufgelöstes Ellipsometrieverfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Probenänderungen beschrieben. Die Probe befindet sich auf einem mit mindestens einer Metallschicht versehenen Probenträger. Mittels der ellipsometrischen Messung werden die Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  ermittelt, wobei der Einfallswinkel und/oder die Frequenz der für die ellipsometrischen Messungen verwendeten elektromagnetischen Strahlung derart eingestellt wird, dass in der Metallschicht eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt wird. Die Detektionsempfindlichkeit ( $\delta \cos \Delta$ )/(Einheit der Probenänderung) wird über die Dicke der Metallschicht eingestellt. Die elektromagnetische Strahlung wird auf der der Probe abgewandten Seite des Probenträgers flächig eingestrahlt und bei mindestens einem Einfallswinkel und mindestens einer Frequenz werden mindestens zwei zeitlich versetzte, simultane, orts aufgelöste ellipsometrische Messungen an der Probe/den Proben durchgeführt und wenigstens die jeweils dazugehörigen  $\Delta$  bzw.  $\cos \Delta$ -Werte zur Ermittlung der Probenänderung ausgewertet. Es wird auch ein Biochip mit mindestens einer Metallschicht versehenen Grundplatte und eine Messanordnung beschrieben, die ein Ellipsometer mit einer Strahlungsquelle (2), einem Polarisator (6), einem Analysator (7) und einem Detektor (9), der ein bildgebender Sensor ist, aufweist. Im Strahlengang vor und hinter der Ein- und Auskoppelvorrichtung (20) für den Biochip (40) ist jeweils ein Linsensystem (5, 8) zur flächigen Ausleuchtung der Ein- und Auskoppelvorrichtung (20) und der Nachweisfläche des Detektors (9) angeordnet. Ferner ist eine Auswerteeinheit (10) zur orts aufgelösten Simultanverarbeitung der Messsignale und mindestens zur orts aufgelösten Simultanwertung der  $\delta \cos \Delta$  Werte vorgesehen.

Ortsaufgelöstes Ellipsometrie-Verfahren zur quantitativen  
und/oder qualitativen Bestimmung von Probenänderungen,  
Biochip und Meßanordnung

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von auf chemischen, biologischen, biochemischen oder physikalischen Effekten beruhenden Probenänderungen, die auf einer Änderung des Brechungsindex und/oder der Schichtdickenänderung der Probe basieren gemäß Patentanspruch 1. Die Erfindung bezieht sich auch auf Verwendungen dieses Verfahrens sowie auf eine entsprechende Meßanordnung gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 28. Ferner bezieht sich die Erfindung auf einen Biochip gemäß des Oberbegriffs des Patentanspruchs 11.

Biologische und chemische Interaktionen, die in flüssigkeitsgefüllten Küvetten unter Bildung dünner Schichten stattfinden, wurden bisher unter anderem durch die Markierung der beteiligten Substanzen durch z.B. fluoreszierende oder radioaktive Moleküle nachgewiesen. Dies wird beispielsweise in S.S. Deshpande, "Enzyme Immunoassays - From Concept to Product Development", Verlag Chapman & Hall, 1996 beschrieben. Dem Vorteil der relativ einfachen Durchführbarkeit steht eine Reihe von Nachteilen gegenüber. So müssen die relevanten Moleküle zunächst markiert bzw. in markierter Form zugekauft werden. Außer dieser zeitaufwendigen Vorbereitungen können durch die Markierung die biologischen oder chemischen Interaktionen beeinflusst werden, was wiederum die Meßergebnisse beeinträchtigt. Die beim Umgang mit radioaktivem Material auftretenden Probleme stellen weitere Nachteile dar.

Aus diesem Grund wurde zunehmend auf direkte Meßmethoden übergegangen, die ohne jegliche Markierung auskommen. Hierbei haben sich zwei Verfahren als geeignet herausgestellt.

Bei der Oberflächenplasmonenresonanzmessung wird in Metallschichten der Dicke von etwa 50 - 60 nm, insbesondere aus Gold oder Silber, die Resonanz der im Metall befindlichen freien Elektronen angeregt (s. E. Gedig, D. Trau und M. Orban, "Echtzeitanalyse biomolekularer Wechselwirkungen", Laborpraxis, Februar 1998, S. 26-28 und 30). Diese Anregung der freien Elektronen tritt nur dann auf, wenn parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht eingestrahlt wird. Für jede Messung muß entweder der Einfallswinkel oder die verwendete Lichtfrequenz durchgeföhren werden, wodurch der apparative Aufwand relativ groß ist. Die reflektierte Intensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei festem Winkel oder des Einfallswinkels bei fester Wellenlänge zeigt im Resonanzbereich ein Minimum.

Da die elektromagnetische Strahlung bei der Reflexion nicht auf den dünnen Metallfilm beschränkt bleibt, sondern über das sogenannte evaneszente Feld mit der ersten etwa 100 bis 300 nm dicken Schicht des darüberliegenden Mediums wechselwirkt, wird der Resonanzwinkel bzw. die Resonanzwellenlänge stark vom Brechungsindex der unmittelbar über der Metallschicht liegenden Schicht beeinflusst. Verändern sich die Resonanzbedingungen, weil z.B. geringe Mengen Wasser durch biologische oder chemische Reaktionen unter Ausbildung einer zusätzlichen Schicht ersetzt werden, verschiebt sich das Minimum der reflektierten Intensität. Aus der Verschiebung läßt sich nur qualitativ das Aufwachsen der Schicht erkennen, nicht aber dessen absolute Dicke, weil dazu noch die Kenntnis des Brechungsindex der aufwachsenden Schicht bekannt sein müßte. Neben dem erheblichen apparativen Aufwand ist daher auch das Meßergebnis nicht allzu aussagefähig. Eine entsprechende Meßvorrichtung wird beispielsweise in der WO 90/05295 beschrieben.

Das zweite Verfahren ist die Ellipsometrie, wobei das Licht derart eingestrahlt wird, daß es ein gasförmiges oder flüssiges Umgebungsmedium durchläuft und anschließend auf die nachzuweisende biologische oder chemische Schicht auftrifft (s. H. Arwin, "Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges", Thin Solid Films 313-314, 1998, S. 764-774).

Bei ellipsometrischen Messungen werden die ellipsometrischen Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  bestimmt, für die gilt:

$$r_p/r_s = (E_{rp}/E_{ep})/(E_{rs}/E_{es}) = \tan \Psi \cdot \exp(i\Delta)$$

$r_p, r_s$ : komplexe Reflektivitäten

E: komplexe elektrische Feldamplitude

Indizes: p: parallel zur Einfallsebene

s: senkrecht zur Einfallsebene

e: eingestrahlt

r: reflektiert

$\Psi$  beinhaltet im wesentlichen die Intensitätsänderung durch Reflexion des Lichts.  $\Delta$  beinhaltet im wesentlichen die Phasenverschiebung durch die Reflexion des Lichts, wobei dieser Parameter sehr empfindlich auf Schichtdicken reagiert.

In der EP 0 067 921 wird ein biologisches Testverfahren zur Bestimmung bioaktiver Substanzen mittels ellipsometrischer Messungen beschrieben. Ein dünnes dielektrisches Substrat wird mit einer Immobilisierungsschicht aus einer ersten biologisch aktiven Substanz beschichtet, die mit einer zweiten bioaktiven Substanz wechselwirkt. Mittels ellipsometrischer Messungen werden die optischen Veränderungen in der biologischen Schicht detektiert. Die Auswertung erfolgt dadurch, daß die ellipsometrischen Parameter zeitabhängig

aufgetragen werden und diese Kurven mit Referenzkurven aus Messungen an biologischem Material bekannter Konzentrationen verglichen werden.

Eine Einstrahlung durch die Rückseite des Substrates wurde zwar auch in Betracht gezogen, die Empfindlichkeit der Messung bei rückwärtiger Einstrahlung war jedoch 30x schlechter als bei vorderseitiger Einstrahlung. Daraus resultiert, daß dieses bekannte Verfahren den Nachteil hat, daß spezielle Küvetten verwendet werden müssen, und Titerplatten gar nicht eingesetzt werden können.

In Sensors and Actuators B 30 (1996), S. 77-80 wird zum Nachweis von DNA-Proben, die auf einer Metallschicht immobilisiert sind, vorgeschlagen, den Polarisationszustand des reflektierten Lichtes zu untersuchen. Als Referenz wird eine Metallschicht ohne DNA-Moleküle untersucht. Hierbei wird sowohl das P- als auch das S-polarisierte Licht eingestrahlt und die Phasenverschiebung zwischen den Proben und dem Referenzsignal ausgewertet. Anstatt die Winkelabhängigkeit der Intensität, wie bei bekannten Oberflächenplasmonen-Messungen, zu untersuchen, wird hier die Winkelabhängigkeit des Polarisationszustandes betrachtet. Bei einer praktischen Realisierung wäre auch hier aufgrund der durchzuführenden Änderungen des Einstrahlwinkels ein komplexer Aufbau notwendig.

In der unveröffentlichten DE 100 06 083.8 wird ein Verfahren beschrieben zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Schichtdicken von sich auf einer, mit einer Immobilisierungsschicht versehenen Metallschicht aufgrund von Interaktionen aus einem gasförmigen oder flüssigen Medium abscheidender biologischer oder chemischer Moleküle mittels ellipsometrischer Messung, bei denen die ellipsometrische Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  ermittelt werden. Hierbei wird der Einfallswinkel und/oder die Frequenz der für die ellipsometrischen Messungen verwendeten elektromagnetischen Strahlung derart eingestellt, daß in der Metallschicht eine Oberflächenplasmonenresonanz erzeugt wird.

Die Detektionsempfindlichkeit ( $\delta \cos \Delta$ /Dicke der zu bestimmenden Schicht) wird über die Dicke der Metallschicht eingestellt. Die elektromagnetische Strahlung wird auf der der Immobilisierungsschicht abgewandten Seite der Metallschicht eingestrahlt.

Mindestens eine ellipsometrische Messung wird während oder nach der Abscheidung durchgeführt und wenigstens der dazugehörige  $\cos \Delta$ -Wert wird zur Ermittlung der Dickenänderung der zu bestimmenden Schicht ausgewertet.

Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß lediglich Einzelproben untersucht werden können. Die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben ist zeitaufwendig, weil die einzelnen Proben nacheinander in den Strahlengang der Meßanordnung gebracht werden müssen. Es ist mit diesem Verfahren nicht möglich, gleichzeitig mehrere Proben zu untersuchen.

Im biologischen Bereich ist es jedoch notwendig, in kurzer Zeit eine Vielzahl von Proben zu untersuchen, insbesondere bei biologischen Vorgängen, die auf intermolekularen Kopplungsreaktionen beruhen, die auch biomolekulare Interaktionen genannt werden. Beispielsweise beruht die heilsame Wirkung von Antikörpern im menschlichen Körper darauf, daß diese Antikörper schädliche Objekte (Proteine, Viren, Bakterien, Pollen etc.) erkennen und dafür sorgen, daß diese unschädlich gemacht werden. In der Regel erfolgt die Erkennungsreaktion nach einem Schlüssel-Schloß-Prinzip, d.h. der Antikörper heftet sich gezielt an das schädliche Objekt. Ähnlich verhält es sich mit vielen Medikamenten, deren Bestandteil sich an bestimmten Stellen des Körpers anlagern und dort wirken. Je gezielter sich das Medikament anlagert, desto spezifischer kann es wirken. Die Suche nach neuen Medikamenten ist daher eng mit der Aufgabe verknüpft, die molekularen Interaktionen von vielen verschiedenen Substanzen zu ermitteln (drug screening).

Besonders vielversprechend sind in diesem Zusammenhang gentechnische Ansätze, bei denen die DNA und die RNA von zentraler Bedeutung sind. Um das Wissen beispielsweise des menschlichen Genoms nutzbar machen zu können, muß die Funktion einzelner DNA-Bestände zunächst ermittelt werden. Hierzu ist es u.a. notwendig, Unterschiede zwischen den DNA-Beständen gesunder und kranker Lebewesen zu erkennen. Es existieren bereits Methoden, um gezielt unterschiedliche DNA-Stränge bestimmter Länge und Basenpaaren auf Oberflächen zu immobilisieren. Hierzu werden sogenannte DNA-Arrays oder DNA-Chips mit matrixartiger Anordnung von DNA-Spots verwendet. Die DNA-Stränge können beispielsweise mit piezoelektrischen Verfahren aufgespottet oder direkt auf der Chipoberfläche mittels photolithographischer Verfahren synthetisiert werden.

Über sogenannte Hybridisierungsreaktionen (zwei einzelne, zueinander komplementäre DNA- bzw. RNA-Stränge bilden einen Doppelstrang) läßt sich beispielsweise ermitteln, wo Unterschiede zwischen gesunden und krankheitsfördernden DNA-Fragmenten auftreten. Des weiteren gibt es auch Interaktionen zwischen DNA- bzw. RNA-Fragmenten und Proteinen, da die Proteinproduktion in Zellen durch die DNA und RNA gesteuert wird, was auch als Transkription und Translation bezeichnet wird. Bei sogenannten cDNA-Arrays wird der Frage nachgegangen, welche DNA in mRNA übersetzt wird.

Immobilisiert man eine DNA-Helix derart auf einer Oberfläche, daß die Helixachse annähernd senkrecht auf der Oberfläche steht, so beträgt die Höhe pro Basenpaar zwischen etwa 0,2 nm und 0,4 nm, je nach Helixtyp. Die gängige Anzahl von Basenpaaren auf DNA-Chips liegt bei 8 bis 25, womit man eine Höhe der Stränge von etwa 2 bis 8 nm erhält. Der Helixdurchmesser liegt bei ca. 1,8 bis 2,6 nm. Je nach DNA-Belegungsdichte kann die mittlere Schichtdicke auch deutlich unter 1 nm liegen, was ein entsprechend empfindliches Detektionsverfahren erforderlich macht.

Typischerweise werden auf einem DNA-Chip einige hundert bis einige tausend verschiedene Basensequenzen aufgebracht. Ein sogenannter Spot enthält eine gewisse Anzahl von DNA-Strängen mit identischer Basensequenz. Selbst bei einer vergleichsweise kleinen Anzahl von acht Basen pro Strang müssen tausende von Spots aufgebracht werden, um alle möglichen Basensequenzen zu berücksichtigen. Die Detektion der Hybridisierung erfordert somit ein empfindliches Meßverfahren, mit dem möglichst viele Spots gleichzeitig analysiert werden können.

Auch bei anderen biochemischen Interaktionen, wie z.B. Antikörper-Antigenreaktionen, ist es von großem Interesse die Kopplungsstärke zu bestimmen, da sich hieraus Ansätze für neue pharmazeutische Produkte ergeben können.

Die hier betrachteten Kopplungsreaktionen führen zu einer Massenzunahme auf einer Oberfläche, die mit einer Änderung des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Oberfläche einhergeht. Diese Brechungsindexänderung ist prinzipiell meßbar. Derzeit werden jedoch hauptsächlich sogenannte Fluoreszenzreader eingesetzt, um die oben genannten biochemischen Reaktionen zu detektieren. Fluoreszenzreader sind allerdings nicht in der Lage, direkt eine Massenzunahme zu messen, sondern erfordern eine Markierung der Moleküle mit einem Fluoreszenzlabel.

Fluoreszenzlabel haben jedoch den Nachteil, daß sie nach kurzer Zeit ausbleichen, was die quantitativen Auswertungen erschwert. Zur Detektion werden in der Regel extrem empfindliche sogenannte rauscharme CCD-Kameras benötigt, die dementsprechend auf tiefe Temperaturen gekühlt werden müssen.

In Graham Ramsey "DNA-Chips: State of the Art", Nature Biotechnology, Vol. 16, Jan. 98, Seite 40 bis 44 werden verschiedene DNA-Chips

beschrieben. Die Grundplatte solcher DNA-Chips besteht beispielsweise aus Silizium, wobei diese Chips zur Beschleunigung des Hybridisierungsvorgangs gelabelter Proben auch Mikroelektroden aufweisen können.

In Steel et al. "Electrochemical Quantitation of DNA-Immobilize on Gold", Analytical Chemistry, Vol. 70, Nr. 22, Nov. 15, 1998 werden auf Glaskörper aufgesputterte Goldschichten beschrieben, die als Elektroden dienen. DNA-Chips, die für den Einsatz in empfindlichen optischen Meßverfahren geeignet sind, werden nicht beschrieben.

Es ist Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, daß eine schnelle und simultane Messung einer Vielzahl von Proben bei gleichzeitig größerer Nachweisempfindlichkeit gewährleistet, wobei nicht nur der qualitative sondern auch der quantitative Nachweis von Probenveränderungen möglich sein soll. Es ist auch Aufgabe der Erfindung, eine entsprechende Meßanordnung für die Durchführung des Verfahrens zur Verfügung zu stellen. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, Biochips bereitzustellen, die zum Einsatz in diesem Verfahren bzw. der Meßanordnung geeignet sind.

Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von auf chemischen, biologischen, biochemischen oder physikalischen Effekte beruhenden Probenänderungen gelöst, die auf einer Änderung des Brechungsindex der Probe basieren, wobei sich die Probe auf einem mit mindestens einer Metallschicht versehenen Probenträger befindet, mittels ellipsometrischer Messungen, bei denen die ellipsometrischen Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  ermittelt werden, wobei

- der Einfallswinkel und/oder die Frequenz der für die ellipsometrischen Messungen verwendeten elektromagnetischen Strahlung derart eingestellt wird, daß in der Metallschicht eine gedämpfte

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR = Surface Plasmon Resonance) angeregt wird,

- die Detektionsempfindlichkeit ( $\delta \cos \Delta$ )/(Einheit der Probenänderung) über die Dicke der Metallschicht eingestellt wird,
- die elektromagnetische Strahlung auf der der Probe abgewandten Seite des Probenträgers flächig eingestrahlt wird und
- bei mindestens einem Einfallswinkel und mindestens einer Frequenz mindestens zwei zeitlich versetzte, simultane, orts aufgelöste ellipsometrische Messungen an der Probe/den Proben durchgeführt werden und wenigstens die jeweils dazugehörigen  $\Delta$ - bzw.  $\cos \Delta$ -Werte zur Ermittlung der Probenänderung ausgewertet werden.

Die Erfindung eignet sich zum Nachweis aller physikalischen, chemischen, biologischen oder biochemischen Vorgängen, bei denen sich der Brechungsindex in der Nähe einer Oberfläche hinreichend stark ändert, insbesondere aber für die oben beschriebenen Kopplungsreaktionen auf einem flachen Biochip, wie nachfolgend noch im einzelnen erläutert wird.

Unter Probenänderungen werden insbesondere das Aufwachsen von Schichten aus biologischen oder chemischen Molekülen verstanden, die sich auf einer Immobilisierungsschicht aus einem Fluid abscheiden, insbesondere die eingangs erläuterten Veränderungen aufgrund biochemischer Interaktionen, aber auch physikalische Veränderungen, wie z.B. das Schrumpfen oder Quellen von Polymerschichten.

Es hat sich gezeigt, daß der ellipsometrische Parameter  $\Delta$  durch die Oberflächenplasmonenanregung stark beeinflußt wird. Wenn die Wellenlänge und/oder der Einfallswinkel der verwendeten elektromagnetischen Strahlung bezüglich des verwendeten Metalls so eingestellt wird, daß eine Oberflächenplasmonenanregung auftritt, erhöht sich die Detektionsempfindlichkeit erheblich und liegt in einer Größenordnung über

diejenigen, die bei der konventionellen Ellipsometrie, d.h. ohne Anregung der Oberflächenplasmomen, erreicht werden kann. Dadurch ist es möglich, z.B. deutlich geringere Schichtdickenänderungen zu detektieren bzw. das Aufwachsen durch biologische oder chemische Interaktionen bewirkter Schichten bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu erkennen.

Während beim Stand der Technik die rückwärtige Einstrahlung ohne metallische Beschichtung schlechte ellipsometrische Meßergebnisse liefert, wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren dieser Nachteil nicht festgestellt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß gemäß der Erfindung eine signalverstärkende Metallschicht verwendet wird. Es wird dadurch möglich, z.B. mit einer solchen Metallschicht versehene, ansonsten jedoch herkömmliche Küvetten zu verwenden und die Messung an der Bodenwand der Küvetten durchzuführen.

Da die Ellipsometrie noch einen weiteren Parameter, nämlich  $\Psi$  liefert, ist es nicht notwendig, den mit der Probenänderung verknüpften Brechungsindex zu kennen, um Absolutwerte bestimmen zu können. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können somit mehr Informationen bei größerer Genauigkeit erhalten werden. Wenn z.B. die absolute Dicke der aufgewachsenen Schicht bestimmt werden soll, wird zusätzlich zum  $\cos\Delta$  noch der  $\tan \Psi$  ausgewertet.

Im Gegensatz zur konventionellen Ellipsometrie kann durch das erfindungsgemäße Verfahren die Signalhöhe und damit die Detektionsempfindlichkeit zusätzlich noch weiter vergrößert werden, wenn die Dicke der Metallschicht optimiert wird. Durch die Einstellung der Dicke der Metallschicht ist es möglich, die Steigung der  $\cos\Delta$ -Kurve zu vergrößern und das Verhältnis  $\delta\cos\Delta$  zur Probenänderung anzuheben. Dadurch wird zwar der Dynamikbereich hinsichtlich der maximal meßbaren Probenänderungen möglicherweise eingeschränkt, da die gesamte  $\cos\Delta$ -Änderung grundsätzlich nicht größer als 2 sein kann, dies ist jedoch insofern kein Nachteil, weil bei

Bedarf über die Wahl der Schichtdicke oder die Lichtwellenlänge die  $\cos\Delta$ -Änderung auch wieder reduziert werden kann.

Zur Ermittlung von Schichtdickenänderungen oder Brechungsindexänderungen wird vorzugsweise die spektrale Verschiebung der  $\tan\Psi$  und  $\cos\Delta$ -Kurven ermittelt. Mittels eines Simulationsprogramms kann daraus die Änderung der Schichtdicke oder des Brechungsindex relativ und absolut berechnet werden.

Ist beispielsweise das zu untersuchende Schichtsystem hinreichend genau bekannt und homogen über die gesamte Detektionsfläche, kann auch bei nur einer Wellenlänge gemessen werden, so daß nicht die spektrale Verschiebung der  $\tan\Psi$ - und  $\cos\Delta$ -Kurven ermittelt wird, sondern die Änderung der  $\tan\Psi$ - und  $\cos\Delta$ -Werte bei einer festen Wellenlänge. Dies setzt allerdings voraus, daß der Schichtdickenzuwachs bzw. die Brechungsindexänderung nicht zu groß ist, da der Dynamikbereich des  $\cos\Delta$ -Wertes auf  $-1$  bis  $+1$  beschränkt ist.

Unter Umständen genügt dort die Auswertung einer der beiden ellipsometrischen Meßgrößen. Meist erweist sich der  $\cos\Delta$ -Wert als der sensitivere Wert.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß nach der Einstellung der Parameter für die Oberflächenplasmonenanregung weder die Wellenlänge noch der Einfallswinkel unbedingt variiert werden muß. Dies ist ein erheblicher Vorteil hinsichtlich des apparativen Aufwandes gegenüber Meßverfahren, bei denen einer dieser Parameter variiert werden muß. Mit dem Verfahren lassen sich mehr Proben pro Zeiteinheit untersuchen als es bisher der Fall war, weil auf das systematische Durchfahren des Einstrahlwinkels und der Wellenlänge verzichtet werden kann.

Gegenüber konventionellen SPR-Meßanordnungen erzielt man den Vorteil, daß ellipsometrische Messungen prinzipiell mehr Informationen liefern, da sie zwei

Größen gleichzeitig ermitteln ( $\Psi$  und  $\Delta$ ). Dadurch können präzisere quantitative Aussagen zu Schichtdicken-Änderungen oder Brechungsindexänderungen gemacht werden. Deswegen genügt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine grobe spektrale Auflösung, wohingegen bei spektralen SPR-Messungen die genaue Lage eines schmalen Reflektionsminimums gefunden werden muß. Die erfindungsgemäße Meßanordnung ist darüber hinaus unempfindlicher gegenüber zeitlichen Intensitätsschwankungen der Lichtquelle und des Umgebungslichtes, da stets eine Normierung durch das s-polarisierte Licht stattfindet. SPR-Messungen mit Winkelvariationen sind im Gegensatz zum erfindungsgemäßen Verfahren prinzipiell nicht für zweidimensionale orts aufgelöste Simultanmessungen geeignet, weil eine räumliche Dimension bereits für die Bestimmung des winkelabhängigen Reflektivitätsminimums benötigt wird.

Die ellipsometrische Charakterisierbarkeit aller beteiligten Schichten ist ein immanenter Vorteil der Erfindung gegenüber allen nicht-ellipsometrischen SPR-Meßverfahren.

Gegenüber fluoreszenzbasierten Meßverfahren weist die Erfindung den beträchtlichen Vorteil der markierungsfreien Detektion auf, was die biochemische Präparation erleichtert und preiswerter macht. Die biologischen Interaktionen werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht durch ein Fluoreszenzlabel verfälscht. Ein erheblicher Vorteil der Erfindung ist auch, daß es keine Ausbleicheffekte wie bei fluoreszenzbasierten Verfahren gibt. Dieses Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs stellt bekanntermaßen ein großes Problem bei quantitativen Analysen von Kopplungsreaktionen dar. Im Gegensatz zu Fluoreszenzdetektoren wird für das erfindungsgemäße Verfahren keine hochempfindliche Kamera benötigt, da ein wesentlich größerer Intensitätsanteil des eingestrahlten Lichtes für die Detektion zur Verfügung steht.

Gegenüber Meßmethoden, die auf radioaktiver Markierung beruhen, ergeben sich vergleichbare Vorteile wie gegenüber der Fluoreszenzmarkierung. Zudem kann das Hantieren mit radioaktiven Substanzen vermieden werden.

Gegenüber massenspektroskopischen Verfahren ergibt sich hauptsächlich der Vorteil des wesentlichen geringeren gerätetechnischen Aufwandes, da keine Vakuumtechnik notwendig ist. Massenspektroskopische Verfahren liefern andere experimentelle Daten und stellen daher eine Ergänzung optischer Methoden dar.

Aufgrund der relativ kleinen auszumessenden Fläche eines Biochips von in der Regel wenigen  $\text{cm}^2$  kann der gesamte Chip leicht mit einer einzigen orts aufgelösten Messung erfaßt werden. Besonders geeignet ist das Verfahren, eine Vielzahl von biochemischen Bindungsereignissen simultan nachzuweisen. Hierzu wird ein flacher Biochip, der mit einer Metallbeschichtung versehen ist, mit zahlreichen unterschiedlichen Fängermolekülen beladen. Die auf der Metallschicht ggf. mit einem sogenannten Spacer (Moleküle zur Erzielung günstiger sterischer Bedingungen) immobilisierten Fängermoleküle sind in der Lage, sehr spezifische Moleküle aus einer Lösung heraus an sich zu binden. Die dadurch hervorgerufene Massenzunahme auf der Oberfläche, kann über die damit einhergehende Änderung des Brechungsindex gemessen werden. Bei den Fängermolekülen kann es sich beispielsweise um die DNA-Stücke (Oligonucleotide), Antikörper, Aminosäureketten (Peptide), aber auch um Viren oder Bakterien handeln. Die Immobilisierung der Fängermoleküle kann z.B. über Streptavidin-Biotin-Bindungen, Verfahren der Thiolchemie oder andere naßchemische Verfahren erreicht werden.

Ein anderes geeignetes Verfahren ist die Immobilisierung von Fängermolekülen auf den mit einer geeigneten Metallschicht versehenen Küvettenböden von Titerplatten. Hier werden meist alle Küvetten mit gleichartigen Fängermolekülen versehen, während anschließend in jede Küvette

unterschiedliche Lösungen gegeben werden. Bei entsprechender Auslegung der Erfindung kann auch hier die gesamte Titerplatte mit einer Aufnahme des bildgebenden Sensors vermessen werden.

Ferner sind kinetische (zeitaufgelöste) Bindungsmessungen möglich sowie auch die Messung von stationären Zuständen (in der Regel Anfangs- und Endzustände). Die letztere Art der Messung wird oft eingesetzt, um sogenannte Hits zu untersuchen. Dabei handelt es sich um pharmazeutisch relevante Bindungsereignisse, die eine vorgegebene Affinitätsschwelle überschreiten.

Vorzugsweise werden die simultan, orts aufgelösten ellipsometrischen Messungen während sowie vor und/oder nach der Probenveränderungen durchgeführt. Die Messungen vor der Probenveränderung dienen als Referenzmessung, die mit der oder den Messungen während oder nach der Probenänderung verglichen werden. Aus der Änderung des  $\cos\Delta$  läßt sich eine Aussage über die Stärke der Probenveränderung machen. Die Referenzmessungen können auch für unterschiedliche Proben verwendet werden.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, daß kontinuierliche ellipsometrische Messungen mindestens während eines Zeitabschnitts der Probenänderungen durchgeführt werden und wenigstens die zeitliche Änderung der dazugehörigen  $\cos\Delta$ -Werte ausgewertet wird. Mit den Messungen läßt sich beispielsweise das Aufwachsen der nachzuweisenden Schicht verfolgen.

Vorzugsweise wird eine Metallschicht aus einem Metall verwendet, das im Wellenlängenbereich der verwendeten elektromagnetischen Strahlung einen Brechungsindex (Realteil) von  $< 1$  aufweist. Vorteilhafterweise wird eine Metallschicht aus Kupfer, Gold, Silber oder Aluminium oder eine Legierung verwendet, die diese Metalle enthält.

Während bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie nach dem Stand der Technik Metallschichten  $\geq 50$  nm verwendet werden, hat es sich herausgestellt, daß für das erfindungsgemäße Verfahren Dicken zwischen 10 und 45 nm, vorzugsweise zwischen 10 und 40 nm weitaus besser geeignet sind. Bei Schichtdicken  $\geq 50$  nm verläuft die  $\cos\Delta$ -Kurve in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtfrequenz deutlich flacher und der Dynamikbereich zwischen - 1 und + 1 wird nicht ausgeschöpft. Bei Dicken der Metallschicht von  $\leq 10$  nm ergeben sich jedoch zu geringe Sensitivitäten.

Die bevorzugte Dicke der funktionellen Teilschicht zwischen 20 nm und 40 nm sorgt dafür, daß der Reflektivitätseinbruch bei der Oberflächenplasmonenresonanz verringert und spektral verbreitert ist. Dieses physikalische Verhalten wird als gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz (gedämpfte SPR) bezeichnet. Die gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz führt dazu, daß der Verlauf der ellipsometrischen Meßgrößen  $\tan\Psi$  und  $\cos\Delta$  bei Wellenlängenvariationen nicht sprunghaft ist. Dies beinhaltet den Vorteil, daß die spektrale Auflösung der gesamten Meßanordnung relativ gering sein kann, was Kosten und Meßzeit einspart. Die Messung bei einigen diskreten Wellenlängen genügt in der Regel, um den spektralen Verlauf von  $\tan\Psi$  und  $\cos\Delta$  hinreichend genau zu charakterisieren. Diese Charakterisierung ist insbesondere dann notwendig, wenn die beteiligten Schichten (funktionelle Metallschicht, Vermittlungsschicht, biochemische Schichten etc.) noch nicht genau bekannt sind. Die ellipsometrische Charakterisierbarkeit der beteiligten Schichten ist ein immanenter Vorteil gegenüber nicht-ellipsometrischen SPR-Meßvorrichtungen. Vorzugsweise werden alle Messungen in der Nähe des Nulldurchgangs des  $\cos\Delta$  auf der Wellenlängenskala durchgeführt, da hier die Detektionsempfindlichkeit am größten ist.

Es ist auch möglich, die ellipsometrischen Messungen an ruhenden oder fließenden Medien durchzuführen.

Vorzugsweise wird elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 10  $\mu$ m, vorzugsweise von 300 nm bis 3  $\mu$ m verwendet.

Vorzugsweise wird monochromatische Strahlung, insbesondere Licht eingesetzt. Der Vorteil der monochromatischen Strahlung besteht darin, daß die Strahlung vor der Detektion nicht spektral gefiltert werden muß.

Als Strahlungsquellen können Laser eingesetzt werden. Es ist aber auch möglich, Lampen, wie z.B. Xenonlampen mit breiter Spektralverteilung als Strahlungsquelle zu verwenden, wobei dann vorteilhafterweise vor der Detektion eine spektrale Filterung durchzuführen ist.

Das Verfahren wird vorzugsweise an einem mit mehreren Spots versehenen Biochip durchgeführt oder an mehreren Mikroreaktionsgefäßen einer Titerplatte durchgeführt.

Eine bevorzugte Verwendung des Verfahrens ist die Untersuchung biochemischer Interaktionen auf der Basis von DNA- oder RNA-Hybridisierung, DNA- oder RNA-Protein-Wechselwirkungen, DNA- oder RNA-Antikörper-Wechselwirkungen oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkung.

Das Verfahren kann zu Antikörpercharakterisierung, Entwicklung von Immunoassays, Elisaoptimierung (ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay), Konzentrationsbestimmungen kleiner Analytmengen, Membranstudien oder für die Erforschung von Signaltransduktionsketten eingesetzt werden.

Das Verfahren ist auch zur Untersuchung von physikalischen oder chemische Probenänderungen geeignet, bei denen die Eigenschaften (komplexer Brechungsindex, Schichtdicke, optische Anisotropie, etc.) von dünnen Schichten orts aufgelöst bestimmt werden. Beispielsweise kann das Schrumpfen oder Quellen von Polymerschichten untersucht werden. Des weiteren kann der komplexe Brechungsindex von Flüssigkeiten oder polymerisierten festen

Stoffen ermittelt werden. Ferner sind auch die Konzentrationsänderungen von Ionen, Glukose oder anderen Inhaltsstoffen in einer Flüssigkeit bestimmbar. Es kann beispielsweise der Diffusionsprozeß von löslichen Substanzen zweidimensional orts aufgelöst in seiner zeitlichen Entwicklung verfolgt werden.

Ein in dem Verfahren einsetzbarer Biochip besitzt einen Probenträger aus einer mit mindestens einer Metallschicht versehenen Grundplatte, bei dem der Probenträger aus einem Material besteht, das im elektromagnetischen Wellenlängenbereich zwischen 100 nm und 10 µm mindestens in einem Wellenlängenabschnitt von mindestens 10 nm Breite eine Transmission von mindestens 20% aufweist und bei dem die Metallschicht aus Kupfer, Silber, Gold oder Aluminium aus einer Legierung besteht, die wenigstens eines dieser Metalle zu mindestens 5 Gew.-% enthält, wobei die Dicke der Metallschicht oder die Gesamtdicke mehrerer Metallschichten zwischen 10 und 45 nm, insbesondere zwischen 20 und 40 nm liegt.

Unter Biochips werden DNA-Chips, RNA-Chips, Elektrophoresechips und Proteinchips verstanden. Zu den DNA- bzw. RNA-Chips gehören die sogenannten DNA-Arrays, die eine Vielzahl von Spots aufweisen. Auch DNA-Chips mit lediglich einer Probensubstanz zählen hierzu.

Vorzugsweise besteht die Grundplatte des Probenträgers aus einem der Materialien BK7, SF10, SF11, ZrO<sub>2</sub>, fused Silica, CrO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Quarz und/oder einem transparenten Kunststoff.

Vorzugsweise ist zwischen der Metallschicht und der Grundplatte eine Haftvermittlungsschicht angeordnet.

Die Haftung der funktionellen Metallschicht auf dem transparenten Träger wird durch diese Haftvermittlungsschicht verbessert. Hierbei kann es sich um eine

hinreichend dünne Schicht, z.B. aus Titan oder Chrom handeln. Die Haft-Vermittlungsschicht wird so dünn gewählt, daß sie keinen störenden Einfluß auf die Oberflächenplasmonenresonanzanregung hat. Die Dicke liegt daher vorzugsweise bei 1 nm bis 20 nm.

Auf der Metallschicht kann eine nicht-metallische Deckschicht aufgebracht sein, die beispielsweise aus Glas, Metalloxyd, Halbleiteroxid und/oder Kunststoff bestehen kann. die Schichtdicke liegt vorzugsweise bei maximal 500 nm.

Vorzugsweise weist die Deckschicht im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 10µm mindestens in einem Wellenlängenabschnitt der Breite von 10 nm bei senkrechtem Einfall eine Transmission von < 10% auf.

Durch eine Oberflächenbehandlung, z.B. mit chemischen Lösungen und/oder Plasmen kann eine hydrophile oder hydrophobe Oberfläche der Deckschicht oder der Metallschicht eingestellt werden.

Vorzugsweise ist auf der Metallschicht oder der Deckschicht eine biochemische Immobilisierungsschicht aufgebracht.

Vorteilhafterweise sind auf der Metallschicht oder der Deckschicht DNA-Spots aufgebracht.

Vorteilhafterweise trägt die Unterseite der Grundplatte eine Einrichtung zur flächigen Einkopplung und Auskopplung von elektromagnetischer Strahlung. Eine derartige Einrichtung kann beispielsweise ein Prisma sein. Ein trapezförmiges Prisma kann aus einem oder mehreren Teilstücken bestehen, die bei Bedarf zusammengeklebt sein können. In Abhängigkeit von der Brechzahl des verwendeten Materials für die Prismen ändert sich der Einfallswinkel des Lichts. Dadurch kann auf die Strahlführung, Leuchtdichte

und optisches Auflösungsvermögen des Ellipsometers Einfluß genommen werden.

Der Brechungsindex des Prismas sollte weitgehend mit dem der transparenten Grundplatte übereinstimmen. Zwischen Prisma und Grundplatte sollte ein Medium eingebracht werden, das ebenfalls einen möglichst ähnlichen Brechungsindex aufweist. Hierbei kann es sich um ein Öl, eine andere geeignete Flüssigkeit oder einen flexiblen Festkörper handeln. Wenn ein flüssiges oder zähflüssiges Medium verwendet wird, kann dies manuell oder mit Hilfe einer Pumpvorrichtung aufgetragen werden.

Die Metallschicht oder Schichten können an eine Spannungsquelle angeschlossen sein. In diesem Fall dient die Metallschicht zusätzlich als Elektrode.

Wenn die Metallschicht auf dem transparenten Träger gleichzeitig als Elektrode verwendet wird, kann die Wanderung von geladenen Teilchen in einer Flüssigkeit beeinflusst, d.h. beschleunigt oder behindert werden. Zu diesem Zweck kann sich an einer anderen Stelle in der Flüssigkeit, die die geladenen Teilchen enthält, eine Gegenelektrode befinden. Die Elektroden können elektrischen Kontakt zur Flüssigkeit haben oder durch nichtleitende Schutzschichten, z.B. aus  $\text{SiO}_2$ , elektrisch isoliert sein.

Die Metallschicht kann auch partiell unter Ausbildung einer matrixförmigen Struktur aufgebracht sein. Hierbei können die metallischen Matrixelemente jeweils an eine eigene Spannungsquelle angeschlossen sein.

Beispielsweise kann die elektronische Struktur matrixförmig derart ausgeführt sein, daß sie an die matrixförmige Verteilung von DNA-Spots auf einem Biochip angepaßt ist. Dabei ist es möglich, die einzelnen matrixförmigen angeordneten Elektroden mit individuellen Zuleitungen und individuellen

Spannungen zu versorgen. Elektroden können aber auch elektrisch miteinander verbunden sein, so daß nur eine Spannung anzulegen ist.

Die erfindungsgemäße Meßanordnung umfaßt ein Ellipsometer, das eine Strahlungsquelle, einen Polarisator, einen Analysator und einen Detektor sowie eine an den Detektor angeschlossene Auswerteeinrichtung aufweist. Ferner umfaßt die Meßanordnung einen Probenträger für die zu vermessende Probe/vermessenden Proben, deren Grundplatte auf der der Probe zugewandten Seite mindestens eine Metallschicht aufweist. Zwischen dem Analysator und dem Polarisator ist eine optische Ein- und Auskoppelinrichtung am Probenträger angeordnet, wobei die Ein- und Auskoppelinrichtung derart ausgebildet ist, daß die elektromagnetische Strahlung in einem solchen Einfallswinkel auf die Metallschicht gelenkt wird, daß eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt wird. Im Strahlengang vor und hinter der Ein- und Auskoppelinrichtung ist jeweils ein Linsensystem zur flächigen Ausleuchtung der Ein- und Auskoppelinrichtung und der Nachweisfläche des Detektors angeordnet. Der Detektor ist ein bildgebender Sensor und ermöglicht auf diese Weise die simultane orts aufgelöste Messung der Meßsignale. Die Auswerteeinrichtung ist zur orts aufgelösten simultanen Verarbeitung der Meßsignale und mindestens zur orts aufgelösten simultanen Auswerten der  $(\delta\cos\Delta)$ -Werte ausgebildet.

Das Ellipsometer kann ein Nullellipsometer sein, wie dies beispielsweise in Analytical Chemistry Volume 62, Nr. 17, Sept. 1, 1990, Seite 889 beschrieben wird. Es kann sich auch um ein Ellipsometer mit rotierenden Polarisator oder um ein Ellipsometer mit rotierendem Analysator oder um ein phasenmodulierendes Ellipsometer handeln.

Vorzugsweise ist der bildgebende Sensor eine CCD-Kamera oder eine matrixartige Anordnung von Photodioden oder Phototransistoren.

Die Strahlungsquelle kann polychromatisch sein, wobei zwischen Strahlungsquelle und bildgebendem Sensor ein Monochromator mit variabler Wellenlänge oder ein Filterrad mit optischen Bandpaßfiltern verschiedener Wellenlänge angeordnet ist.

Ferner kann die Strahlungsquelle auch eine weitgehend monochromatische Lichtquelle sein oder aus mehreren weitgehend monochromatischen Einzellichtquellen mit unterschiedlichen Lichtwellenlängen bestehen.

Vorzugsweise ist das Linsensystem für die flächige Einstrahlung eine Scheimpflugoptik. Eine Scheimpflugoptik ist vorteilhaft bei der scharfen Abbildung von Ebenen, die nicht parallel zur Detektionsebene liegen.

Die Ein- und Auskoppereinrichtung kann ein Prisma aus BK7, SF10, SF11,  $ZrO_2$ , fused Silica, Quarz oder einem transparenten Kunststoff sein.

Der Probenträger kann den Boden einer Reaktionskammer bilden. Die Reaktionskammer kann eine Temperiereinrichtung und/oder eine Befeuchtungseinrichtung aufweisen.

Sämtliche Ausführungen zu Biochips und Probenträgern sind auch auf Titerplatten übertragbar.

Beispielhafte Ausführungsformen der Erfindung werden nachfolgend anhand der Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

Figur 1        eine erfindungsgemäße Meßanordnung mit einem Biochip,

Figur 2        eine Meßanordnung gemäß einer weiteren Ausführungsform,

- Figur 3 eine Meßanordnung gemäß einer weiteren Ausführungsform mit einer Titerplatte,
- Figur 4 ein vergrößerter Ausschnitt eines Biochips,
- Figur 5a die vergrößerte Darstellung eines Mikroreaktionsgefäßes einer Titerplatte,
- Figur 5b die vergrößerte Darstellung eines Mikroreaktionsgefäßes einer Titerplatte,
- Figur 6 zwei Diagramme zur Erläuterung der Einstellung sowohl der Oberflächenplasmonenresonanz als auch der Dicken der Metallschicht,
- Figur 7 die Messung der Änderungen des  $\delta\cos\Delta$  in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes,
- Figur 8 der  $\delta\cos\Delta$  in Abhängigkeit der Meßzeit ohne Metallschicht,
- Figur 9 der  $\delta\cos\Delta$  in Abhängigkeit der Meßzeit unter Verwendung einer Silberschicht,
- Figur 10 ein Diagramm, in dem  $\delta\cos\Delta$  gegen die Meßzeit beim Hybridisierungsvorgang dargestellt ist unter Verwendung einer Goldschicht, und
- Figur 11 ein dreidimensionales Balkendiagramm zur Erläuterung der orts aufgelösten Messungen.

In der Figur 1 ist eine Meßanordnung 1 schematisch dargestellt. Die elektromagnetische Strahlung 11 einer monochromatischen Lichtquelle, z.B. einer Halogenlampe 2 wird mit einem Linsensystem 3 dem Eintrittsfenster eines optischen Monochromators 4, (Filterad oder scannender Monochromator) angepaßt. Die den Monochromator 4 verlassende Strahlung 11 wird mit einem weiteren Linsensystem 5 parallelisiert und bei Bedarf aufgeweitet.

Die monochromatische Strahlung wird mit einem Polarisator 6 linear polarisiert und fällt senkrecht auf die Eintrittsfläche 21 einer Ein- und Auskoppereinrichtung 20 in Form eines Prismas. Die Strahlung passiert mit gering Reflexionsverlusten und vernachlässigbarer Brechung die Eintrittsfläche 21 und fällt auf eine weitere Prismenoberfläche. Zwischen dieser Prismenoberfläche und dem darauf liegenden transparenten Probenträger 30 befindet sich eine dünne Ölschicht zur Brechungsindexanpassung. Der transparente Träger 30 besteht aus einem homogenen Glas- oder Kunststoffmaterial und weist einen möglichst ähnlichen Brechungsindex auf wie die Ein- und Auskoppereinrichtung 20.

Nachdem die Strahlung die Grundplatte 31 des Probenträgers 30 durchdrungen hat, wird sie an der metallischen Schicht 33 reflektiert, wobei sie aufgrund der Anregung einer gedämpften Oberflächenplasmonenresonanz in ihrer Intensität abgeschwächt und hinsichtlich der Phase bzw. Polarisation verändert wird. Die reflektierte Strahlung trifft auf einen rotierenden Analysator 7, mit dessen Hilfe die reflektionsbedingten Intensitäts- und Phasenänderungen für die S- und P-Komponenten (senkrecht und parallel zur Einfallsebene polarisierte Anteile) der Strahlung bestimmt werden können. Die Strahlung passiert dann ein Linsensystem 8, das vorzugsweise eine Scheimpflugoptik sein kann, mit dem sie auf den bildgebenden Sensor 9 in Form einer CCD-Kamera abgebildet wird. Der bildgebende Sensor 9 leitet seine Signale an eine Auswerte- und Steuereinrichtung 10 weiter, die die Signale weiterverarbeitet und auch den Ablauf der gesamten Messung koordiniert.

In dem hier gezeigten Beispiel, dient die ellipsometrische Meßanordnung zur Analyse eines Biochips 40, auf dem matrixartig DNA-Spots 41 mit unterschiedlichen Basensequenzen aufgebracht sind. Die DNA-Spots 41 sind auf der Metallschicht 33 immobilisiert und von einer wässrigen Lösung umgeben. Die wässrige Lösung kann über einen Zufluß 61 und einen Abfluß 62 ausgetauscht werden. Um Hybridisierungsvorgänge oder andere biologische Interaktionen zu beschleunigen ist ein Rührer 65 mit einem dazugehörigen Antrieb vorgesehen. Die wässrige Flüssigkeit kann mit einer Temperierungsvorrichtung 63 auf eine feste Temperatur eingestellt werden oder während der Messung abgekühlt oder aufgeheizt werden. Für mehrere Strahlungswellenlängen, die sich im Bereich der gedämpften Oberflächenplasmonenresonanz befinden, werden die ellipsometrische Meßgrößen  $\tan\Psi$  und  $\delta\cos\Delta$  orts aufgelöst bestimmt. Mit einer geeigneten Auswerte-Software wird aus den ellipsometrischen Meßdaten die Stärke der biologischen Interaktionen an den verschiedenen DNA-Spots 41 bestimmt.

In der Figur 2 ist eine Meßanordnung gemäß einer weiteren Ausführungsform dargestellt, die sich von der Anordnung der Figur 1 dadurch unterscheidet, daß die auf dem Biochip 40 befindlichen DNA-Spots 41 nicht von einem wässrigen sondern von einem gasförmigen Medium, z.B. Luft, Stickstoff or Argon umgeben sind. Aufgrund des geringen Brechungsindex gasförmiger Medien gegenüber wässrigen Medien ist ein kleinerer Einfallswinkel für die elektromagnetische Strahlung vorgesehen, damit bei gleichem spektralen Bereich eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt werden kann. Biochemische Substanzen sind im allgemeinen in gasförmiger Umgebung stabiler, wenn eine hohe Luftfeuchtigkeit vorliegt. Daher ist neben der Temperierung- auch eine Befeuchtungseinrichtung 66 vorgesehen.

In der Figur 3 ist eine weitere Ausführungsform einer Meßanordnung 1 dargestellt, die sich von der Meßanordnung gemäß der Figur 1 dadurch unterscheidet, daß anstatt eines Biochips 40 eine Titerplatte 50 mit einer

matrixförmigen Anordnung von Vertiefungen (Küvetten 55) analysiert wird. Aufgrund der großen Abmessungen an der Titerplatte werden auch das Prisma und alle übrigen Komponenten entsprechend größer gewählt. Die Küvetten 55 sind mit Flüssigkeit gefüllt. Der übrige temperierte Raum ist jedoch mit einem gasförmigen Medium angefüllt. Zum Schutz von Verdunstungen ist auch hier neben der Temperierung eine Befeuchtungseinrichtung 66 vorgesehen.

In der Figur 4 ist eine vergrößerte Darstellung eines Bereiches eines Biochips 40 im Bereich eines Spots 41 dargestellt. Der Schichtaufbau des Biochips 40 besteht aus einer Grundplatte 31, einer Haftvermittlungsschicht 32, einer Metallschicht 33, einer Deckschicht 34, einer Immobilisierungsschicht 51 und einem bzw. mehreren darauf angebrachten Spots 41.

Die Grundplatte 31 kann z.B. ein gewöhnlicher Objektträger für Mikroskope sein. Typischerweise ist die Grundplatte 31 etwa 1 mm dick. Der Brechungsindex der Grundplatte ist dem des Prismas der Ein- und Auskoppereinrichtung 20 angepaßt. Die Haftvermittlungsschicht 32, beispielsweise aus Titan oder Chrom, weist eine Dicke zwischen 1,5 und 15 nm auf.

Auf der Haftvermittlungsschicht 32 befindet sich die Metallschicht 33 aus Gold mit der Dicke zwischen 20 nm und 30 nm. Die Dicke der Goldschicht 33 stellt ein besonderes Merkmal dar, das diesen Biochip von anderen goldbeschichteten Biochips unterscheidet. Konventionelle goldbeschichtete Biochips weisen in der Regel eine Goldschicht von 50 nm und mehr auf. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist hingegen eine Goldschichtdicke zwischen 20 und 30 nm optimal. Die Metallschicht/Metallschichten werden vorzugsweise durch Aufdampfen oder Aufputtern aufgebracht.

Auf der Metallschicht 33 befindet sich eine matrixförmige Anordnung von DNA-Spots 41 mit unterschiedlichen Basensequenzen. Die Anzahl der DNA-

Spots 41 pro  $\text{cm}^2$  kann bis zu 500 000 betragen. Die DNA-Stränge sind beispielsweise über Beschuß mit Tröpfchen (Aufspotten), photolithographisch oder mit der Phosphoramididmethode auf dem Chip immobilisiert. Zur Lagerung können die DNA-Spots mit einer löslichen biochemischen Schutzschicht versehen sein, die sie vor Denaturierung schützt.

In der Figur 5a ist eine Titerplatte 50 bzw. ein vergrößerter Ausschnitt im Bereich eines Mikroreaktionsgefäßes 55 vergrößert dargestellt. Die Titerplatte 50 unterscheidet sich von einer konventionellen, handelsüblichen Titerplatte dadurch, daß die Grundplatte 31 innerhalb der Mikroreaktionsgefäße 55 eine Goldschicht 33 aufweist, die auf einer Haftvermittlungsschicht 32 aufgebracht ist. Die Haftvermittlungsschicht besitzt eine Dicke von 1,5 nm bis 15 nm und die Goldschicht eine Dicke von 20 nm bis 30 nm. Die transparenten Böden der Mikroreaktionsgefäße können aus Kunststoff oder Glas bestehen. Die Dicke der Grundplatte 31 liegt üblicherweise zwischen 0,1 mm und 1 mm. Die Böden können fester Bestandteil einer aus Kunststoff abgeformten Titerplatte sein oder sie sind Teile einer Glas- oder Kunststoffplatte, die mit einer bodenlosen Titerplatte verklebt ist. Der Brechungsindex der Böden ist dem des Prismas der Ein- und Auskoppelinrichtung angepaßt. Die Unterseite der Titerplatte, die auf die Ein- und Auskoppelinrichtung gelegt wird, ist unstrukturiert und glatt.

Auf der Goldschicht 33 befindet sich eine biochemische Schicht 51 mit Fängermolekülen, welche beispielsweise mit Biotin-Streptavidin-Verbindungen oder mittels Verfahren der Thiolchemie auf dem Gold immobilisiert sein können. Es handelt sich bei der Schicht 51 somit um eine Immobilisierungsschicht. In verschiedenen Mikroreaktionsgefäßen können sich gleichartige oder unterschiedliche Fängermoleküle befinden. Bei den Fängermolekülen kann es sich beispielsweise um Antikörper, Einzelstrang-DNA, Proteine, Peptide oder komplexere Strukturen wie Viren oder Bakterien handeln. Zur Lagerung können die Fängermoleküle mit einer löslichen

biochemischen Schutzschicht versehen sein, die sie vor Denaturierung schützt. Während der Messung befindet sich in den Mikroreaktionsgefäßen eine Flüssigkeit.

In der Fig. 6 ist im oberen Teil der  $\tan\Psi$  und im unteren Teil der  $\cos\Delta$  jeweils in Abhängigkeit von der eingestrahlten Wellenlänge dargestellt. Zur Einstellung der Oberflächenplasmonenresonanz wird das unpolarisierte Licht unter einem Einfallswinkel von beispielsweise  $70^\circ$  auf die Unterseite der Bodenwand einer Küvette gelenkt, wie sie beispielsweise in der Fig. 5b dargestellt ist. Durch die Anregung der Oberflächenplasmonenresonanz in der Metallschicht 5 stellt sich beim  $\tan\Psi$  bei einer bestimmten Wellenlänge ein ausgeprägtes Minimum ein, das mit einer steilen Flanke der entsprechenden  $\cos\Delta$ -Kurve einhergeht.

Nachdem auf diese Art und Weise die Wellenlänge für die Anregung der Oberflächenplasmonenresonanz ermittelt worden ist, erfolgt die weitere Optimierung über die Einstellung der Dicke der Metallschicht. Sowohl für  $\tan\Psi$  als auch für  $\cos\Delta$  sind 5 Kurven für die Dicken 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm und 50 nm aufgetragen. Die Kurven gelten für eine Metallschicht aus Silber; ähnliche Werte ergeben sich für eine Goldschicht. Es ist deutlich zu sehen, daß bei Schichtdicken von 10 nm und 50 nm die  $\cos\Delta$ -Kurven flach verlaufen und die Minima des  $\tan\Psi$  nicht so deutlich ausgeprägt sind. Dünnere Metallschichten eignen sich vorzugsweise zur Bestimmung biologischer Schichten größerer Dicke. Bei Schichtdicken der Metallschicht  $< 10$  nm ergeben sich jedoch eher zu geringe Sensitivitäten. Schichtdicken der Metallschicht  $\geq 50$  nm eignen sich aufgrund des geringen Dynamikbereichs weniger für das erfindungsgemäße Verfahren. Lediglich die Kurven für die Dicken 20 bis 40 nm zeigen einen steilen Anstieg und somit eine hohe Detektionsempfindlichkeit, wobei der gesamte Dynamikbereich zwischen -1 und +1 ausgeschöpft wird.

Nachdem die Optimierung der Wellenlänge, des Einfallswinkels und der Dicke der Metallschicht eingestellt worden ist, wurden Messungen an Proben durchgeführt, die in den Fig. 7 bis 9 dargestellt sind.

In der Fig. 7 ist der  $\cos\Delta$  in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes dargestellt, wobei die linke durchgezogene Kurve Messungen ohne Antikörper und die punktierte Kurve Messungen mit Antikörpern zeigen. Die Messungen wurden an Küvetten mit Böden aus Glas durchgeführt, deren Bodenwand mit einer 12 nm dicken Titanschicht, einer 27 nm dicken Silberschicht und einer 17 nm dicken Streptavidinschicht als Immobilisierungsschicht versehen ist. Der Einfallswinkel des Lichtes liegt bei  $70^\circ$ . Nach einer Interaktionszeit von 10 min wächst eine 2,5 nm dicke Antikörperschicht auf, die durch die Verschiebung der  $\cos\Delta$ -Kurve nachgewiesen wird. Die spektralen Messungen dienen dazu, die optimale Wellenlänge hinsichtlich der Detektionsempfindlichkeiten des Dynamikbereiches zu ermitteln. Im vorliegenden Fall ergab sich ein optimaler Wellenlängenbereich von 640 bis 700 nm. Führt man eine "single-wavelength"-Messung mit beispielsweise 680 nm durch, so läßt sich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Antikörperlösung ein Antikörperschichtdickenzuwachs messen, der näherungsweise proportional zur Betragsänderung des  $\cos\Delta$ -Wertes ist. Nach einer Zunahme der Antikörperschicht um 2,5 nm hat sich der  $\cos\Delta$ -Wert um etwa 0,2 geändert. Die sich ergebende Detektionsempfindlichkeit ( $|\delta\cos\Delta|/\text{Schichtdicke}$ ) beträgt 0,08/nm. Diese Detektionsempfindlichkeit liegt um mehr als eine Größenordnung über derjenigen, die bei "konventioneller Ellipsometrie" (beispielsweise mit einem metallischen Substrat) erreichbar ist.

In der Fig. 8 ist der  $\cos\Delta$  in Abhängigkeit von der Meßzeit dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine Vergleichsmessung, bei der auf der Bodenwand der Küvette die Metallschicht fehlte. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen entweder mit einer wässrigen Pufferlösung oder mit Antikörper-haltigen

wässrigen Lösungen in der Konzentration von 66 pmol/ml bzw. 223 pmol/ml (s. Fig. 8) gearbeitet wurde. Sobald die Antikörper zugesetzt wurden, steigt die  $\cos\Delta$ -Kurve in Abhängigkeit von der Meßzeit an. Der Anstieg ist jedoch kaum zu unterscheiden von  $\cos\Delta$ -Änderungen, die bei Abwesenheit von Antikörpern (nur Pufferlösung) aufgrund thermischer Driften auftreten.

Die Streuung der Meßpunkte ist erheblich und es zeigt sich, daß durch die Verwendung einer Silber- bzw. einer Goldschicht auf der Innenseite der Bodenwand deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden, wie dies in der Figur 9 dargestellt ist. Der Wertebereich des  $\cos\Delta$  wird hierbei von 0,05 bis -0,95 durchlaufen, während der Wertebereich gemäß der Fig. 8 sich nur von -0,57 bis -0,595 erstreckt. Es wird deutlich, daß durch das Vorsehen der Metallschicht und die Einstellung der Oberflächenplasmonenresonanz deutlich größere Signalhöhen erzielt werden können und nicht nur eine Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses, was einfach durch längere Meßzeiten zu erreichen ist.

In der Figur 10 ist ein Diagramm zur Erläuterung des Nachweises von DNA-Hybridisierungen dargestellt. Die nachgewiesenen Einzelstränge der DNA-Moleküle besitzen eine Masse von etwa 6 k Dalton und sind damit deutlich kleiner und schwieriger nachzuweisen als beispielsweise Antikörper (typischerweise 150 k Dalton). Die ermittelte Dicke der hybridisierten DNA-Schicht von etwa 2 nm führt zu einer  $\cos\Delta$ -Änderung von 0,2. Ein derart großes Verhältnis von  $\cos\Delta$ -Änderung zu Schichtdickenänderung wird mit keiner anderen bekannten ellipsometrischen Anordnung erreicht. Die  $\cos\Delta$ -Änderung von 0,2 lag bei dem verwendeten Ellipsometer etwa um den Faktor 100 über dem Detektionslimit. Mit einem optimierten Ellipsometer lassen sich noch geringere Detektionslimits und damit höhere Empfindlichkeit erreichen. Von der  $\tan\Psi$ -Skala wurde der Wert 0,25 aus darstellungstechnischen Gründen abgezogen.

Der Figur 11 ist eine dreidimensionale Darstellung einer simultanen, orts aufgelösten Messung. Es wurde eine simultane, orts aufgelöste Messung an einer Titerplatte (1536'er Format) durchgeführt. Die Anzahl der simultan gemessenen Küvetten betrug 12. Die Vermittlungsschicht bestand aus 10 nm dickem Titan. Die Metallschicht bestand aus 25 nm Gold. Das Balkendiagramm zeigt eine Differenzmessung bei Änderung der Ionenkonzentration:

Messung 1: NaCl-Lösung 0,25 molar

Messung 2: NaCl-Lösung 0,63 molar

Die Balkenhöhe entspricht  $\cos\Delta_1 - \cos\Delta_2$ . Die entsprechende Brechungsindexänderung in der Lösung betrug 0,004. Die verwendete Wellenlänge lag bei 680 nm und der Einfallswinkel bei 70°.

Die einzelnen Balken in den Diagrammen sind einzelnen Küvetten der Titerplatte zugeordnet. Die Messung zeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kleine Brechungsindexänderungen (hier einer Flüssigkeit) simultan, orts aufgelöst gemessen werden können.

**Bezugszeichen**

1	Meßanordnung
2	Strahlungsquelle
3	Linsensystem
4	Monochromator
5	Linsensystem
6	Polarisator
7	Analysator
8	Linsensystem
9	Detektor
10	Auswerteeinrichtung
11	Lichtstrahl
20	Ein- und Auskoppelinrichtung
21	Eintrittsfläche
22	Austrittsfläche
23	Prisma
30	Probenträger
31	Grundplatte
32	Haftvermittlungsschicht
33	Metallschicht
34	Deckschicht
35	biochemische Schicht
40	Biochip
41	DNA-Spot
50	Titerplatte
51	Immobilisierungsschicht
52,53	Seitenwand
54	Flüssigkeit
55	Mikroreaktionsgefäß
60	Reaktionskammer

61	Zufluß
62	Abfluß
63	Temperiertvorrichtung
64	Rührer
65	Rührantrieb
66	Befeuchtungseinrichtung

### Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von auf chemischen, biologischen, biochemischen oder physikalischen Effekten beruhenden Probenänderungen, die auf einer Änderung des Brechungsindex und/oder der Schichtdickenänderung der Probe basieren, wobei sich die Probe auf einem mit mindestens einer Metallschicht versehenen Probenträger befindet, mittels ellipsometrischer Messungen, bei denen die ellipsometrischen Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  ermittelt werden, wobei
  - der Einfallswinkel und/oder die Frequenz der für die ellipsometrischen Messungen verwendeten elektromagnetischen Strahlung derart eingestellt wird, daß in der Metallschicht eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt wird,
  - die Detektionsempfindlichkeit  $(\delta \cos \Delta)/(\text{Einheit der Probenänderung})$  über die Dicke der Metallschicht eingestellt wird,
  - die elektromagnetische Strahlung auf der der Probe abgewandten Seite des Probenträgers flächig eingestrahlt wird und
  - bei mindestens einem Einfallswinkel und mindestens einer Frequenz mindestens zwei zeitlich versetzte, simultane, orts aufgelöste ellipsometrische Messungen an der Probe/den Proben durchgeführt werden und wenigstens die jeweils dazugehörigen  $\Delta$ - bzw.  $\cos \Delta$ -Werte zur Ermittlung der Probenänderung ausgewertet werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die simultanen, orts aufgelösten ellipsometrischen Messungen während sowie vor und/oder nach der Probenänderung durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß kontinuierlich simultane, orts aufgelöste ellipsometrische Messungen mindestens während eines Zeitabschnitts der Probenänderungen durchgeführt werden und wenigstens die zeitliche Änderung der dazugehörigen örtlichen  $\cos\Delta$  Werte ausgewertet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Dicke der Metallschicht zwischen 10 und 45 nm, insbesondere zwischen 20 und 40 nm eingestellt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die ellipsometrischen Messungen an einem ruhenden oder fließenden Medium durchgeführt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 10  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise von 300 nm bis 3  $\mu\text{m}$  verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die simultan orts aufgelösten ellipsometrischen Messungen an einem mit mehreren Spots versehenen Biochip durchgeführt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die simultan orts aufgelösten ellipsometrischen

Messungen an mehreren Mikroreaktionsgefäßen einer Titerplatte durchgeführt werden.

9. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Untersuchung biochemischer Interaktionen auf der Basis von DNA- oder RNA-Hybridisierung, DNA- oder RNA-Protein-Wechselwirkungen, DNA- oder RNA-Antikörper-Wechselwirkungen oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen.
10. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, zur Messung des Schrumpfens oder Quellens von Polymerschichten.
11. Biochip mit einem Probenträger aus einer mit mindestens einer Metallschicht versehenen Grundplatte, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Probenträger (30) aus einem Material besteht, das im elektromagnetischen Wellenlängenbereich zwischen 100 nm und 10  $\mu$ m mindestens in einem Wellenlängenabschnitt von mindestens 10 nm Breite eine Transmission von mindestens 20% aufweist, und  
  
daß die Metallschicht (33) aus Kupfer, Silber, Gold oder Aluminium oder aus einer Legierung besteht, die wenigstens eines dieser Metalle zu mindestens 5 Gew.-% enthält, wobei die Dicke der Metallschicht (33) oder die Gesamtdicke mehrerer Metallschichten zwischen 10 und 45 nm, insbesondere zwischen 20 und 40 nm liegt.
12. Biochip nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Grundplatte (31) aus einem der Materialien BK7, SF10, SF11, ZrO<sub>2</sub>, fused Silica, Quarz und/oder einem transparenten Kunststoff besteht.

13. Biochip nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen der Metallschicht (33) und der Grundplatte (31) eine Haftvermittlungsschicht (32) angeordnet ist.
14. Biochip nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Haftvermittlungsschicht (32) aus Titan oder Chrom mit einer Dicke von 1 nm bis 20 nm besteht.
15. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf der Metallschicht (33) eine nicht- metallische Deckschicht aufgebracht ist.
16. Biochip nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nicht-metallische Deckschicht (34) aus Glas, Metalloxid, Halbleiteroxid und/oder Kunststoff besteht.
17. Biochip nach einem der Ansprüche 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Dicke der nicht-metallischen Deckschicht (34) maximal 500 nm beträgt.
18. Biochip nach einem der Ansprüche 15 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Deckschicht (34) im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 10 $\mu$ m mindestens in einem Wellenlängenabschnitt von 10 nm Breite bei senkrechtem Einfall eine Transmission größer als 10% aufweist.
19. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Metallschicht (33) oder die Deckschicht (34) eine hydrophile oder hydrophobe Oberfläche aufweist.

20. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf der Metallschicht (33) oder der Deckschicht (34) eine biochemische Immobilisierungsschicht (51) aufgebracht ist.
21. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf der Metallschicht (33) oder der Deckschicht (34) DNA-Spots (41) aufgebracht sind.
22. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Unterseite der Grundplatte (31) eine Einrichtung (20) zur flächigen Einkopplung und Auskopplung von elektromagnetischer Strahlung trägt.
23. Biochip nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen der Ein- oder Auskoppeleinrichtung (20) und der Grundplatte (31) eine Immersionsflüssigkeit vorgesehen ist.
24. Biochip nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen der Grundplatte (31) und der Ein- und Auskoppeleinrichtung (20) eine flexible Schicht zur Brechungsindexanpassung angeordnet ist.
25. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Metallschicht (33) an eine Spannungsquelle angeschlossen ist.
26. Biochip nach einem der Ansprüche 11 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Metallschicht (33) partiell unter Ausbildung einer matrixförmigen Struktur aufgebracht ist.

27. Biochip nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß jedes metallische Matricelement an eine eigene Spannungsquelle angeschlossen ist.
28. Meßanordnung mit einem Ellipsometer, das eine Strahlungsquelle, einen Polarisator, einen Analysator und einen Detektor sowie eine an den Detektor angeschlossene Auswerteeinrichtung aufweist, mit einem Probenträger für die zu vermessende/n Probe/n, deren Grundplatte auf der der Probe zugewandten Seite mindestens eine Metallschicht aufweist, und mit einer zwischen dem Analysator und Polarisator am Probenträger angeordneten optischen Ein- und Auskoppereinrichtung, wobei die Ein- und Auskoppereinrichtung derart ausgebildet ist, daß die elektromagnetische Strahlung unter einem solchen Einfallswinkel auf die Metallschicht gelenkt wird, daß eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Strahlengang vor und hinter der Ein- und Auskoppereinrichtung (20) jeweils ein Linsensystem (5,8) zur flächigen Ausleuchtung der Ein- und Auskoppereinrichtung (20) und der Nachweisfläche des Detektors (9) angeordnet ist,
- daß der Detektor (9) ein bildgebender Sensor ist und
- daß die Auswerteeinheit (10) zur orts aufgelösten Simultanverarbeitung der Meßsignale und mindestens zur orts aufgelösten Simultanauswertung der ( $\delta\cos\Delta$ )-Werte ausgebildet ist.
29. Meßanordnung nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Ellipsometer ein Null-Ellipsometer, ein Ellipsometer mit rotierendem Polarisator, ein Ellipsometer mit rotierendem Analysator oder ein phasenmodulierendes Ellipsometer ist.

30. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 oder 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß der bildgebende Sensor eine CCD-Kamera oder eine matrixartige Anordnung von Photodioden oder Phototransistoren ist.
31. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlungsquelle (2) polychromatisch ist und daß zwischen Strahlungsquelle (2) und bildgebendem Sensor ein Monochromator (4) mit variabler Wellenlänge oder ein Filterradd mit optischen Bandpassfiltern verschiedener Wellenlänge angeordnet ist.
32. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlungsquelle (2) eine weitgehend monochromatische Lichtquelle ist oder aus mehreren weitgehend monochromatischen Einzellichtquellen mit unterschiedlichen Lichtwellenlängen besteht.
33. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 bis 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Linsensystem (8) eine Scheimpflugoptik ist.
34. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 bis 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ein- oder Auskoppereinrichtung (20) ein Prisma aus BK7, SF10, SF11, ZrO<sub>2</sub>, fused Silica, CrO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Quarz oder einem transparenten Kunststoff ist.
35. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 28 bis 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Probenträger (30) den Boden einer Reaktionskammer (60) bildet.
36. Meßanordnung nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktionskammer (60) eine Temperiereinrichtung (63) aufweist.

37. Meßanordnung nach einem der Ansprüche 35 oder 36, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktionskammer (60) eine Befeuchtungseinrichtung (66) aufweist.

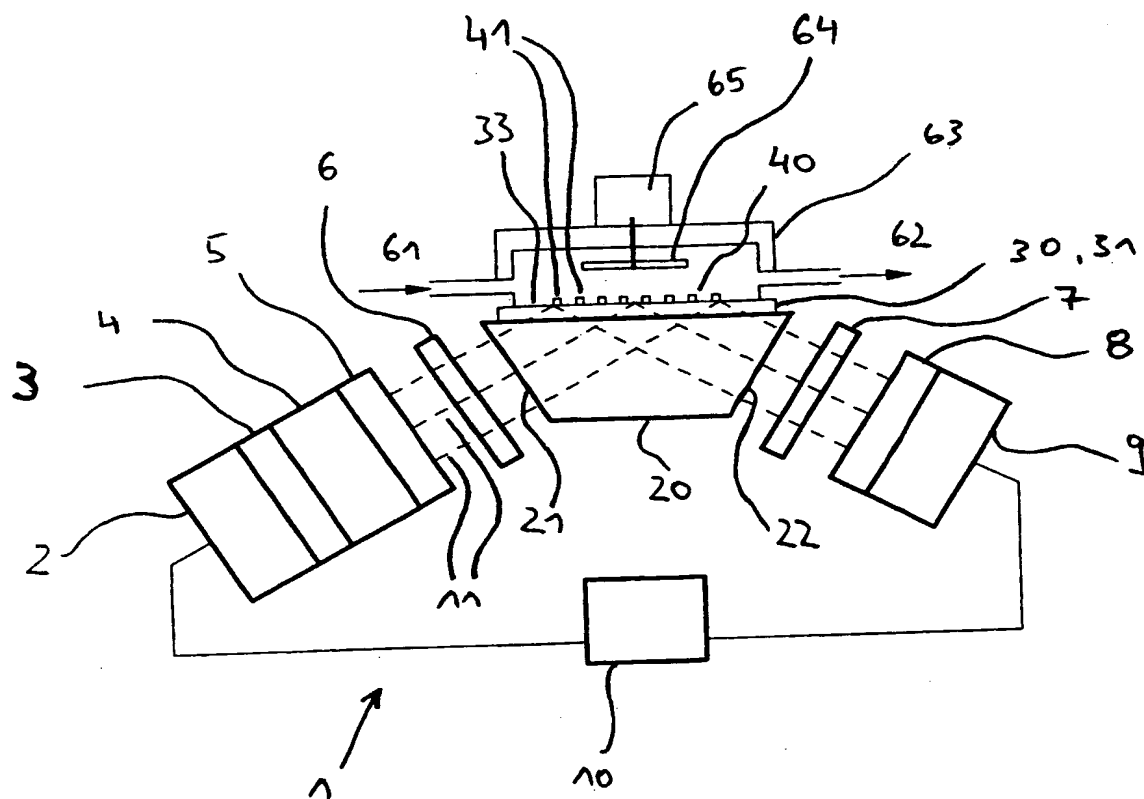


Fig. 1

2/11

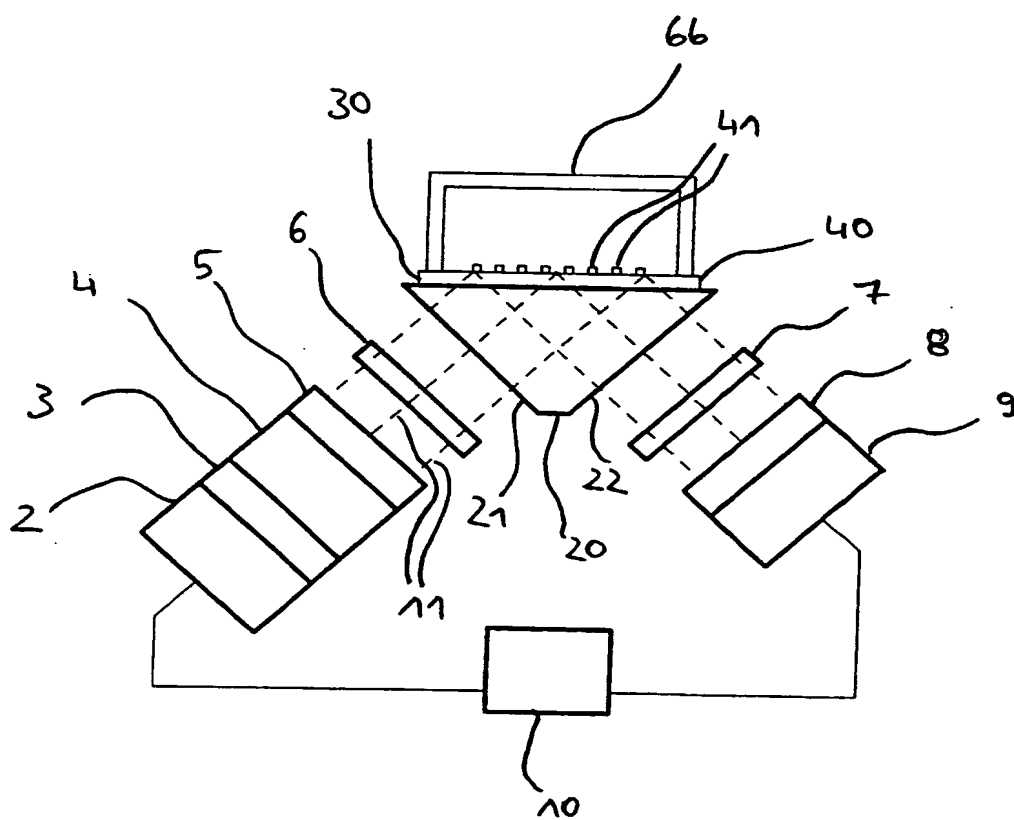


Fig. 2

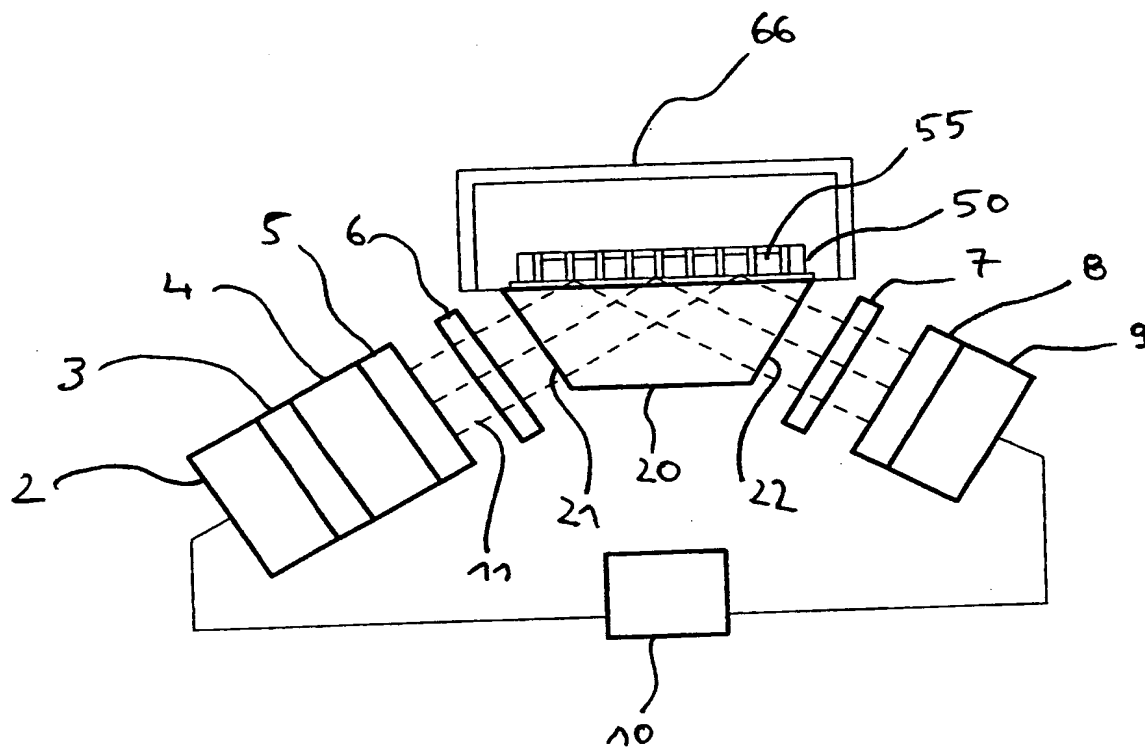


Fig. 3

4/11

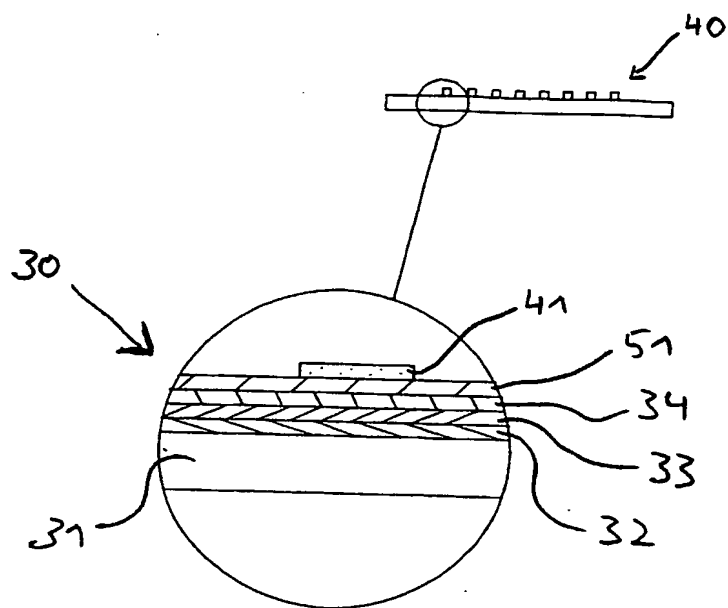


Fig. 4

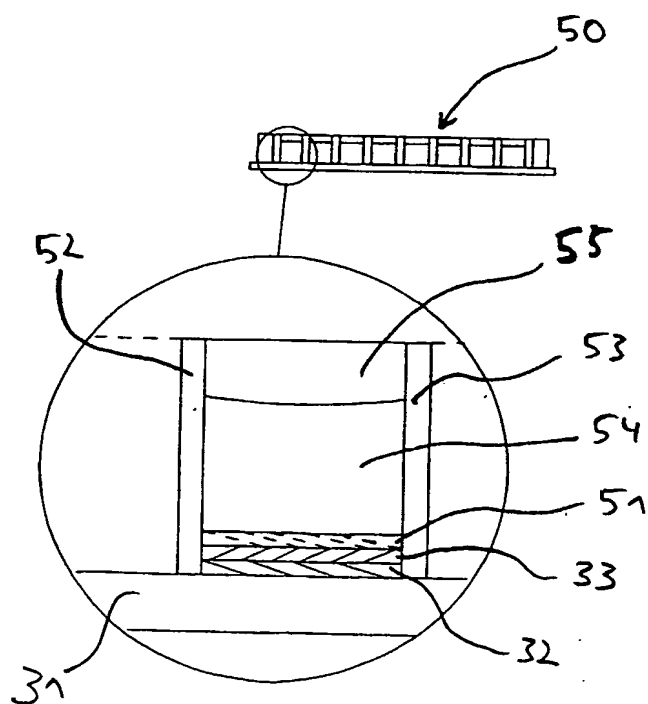


Fig. 5a

5/11

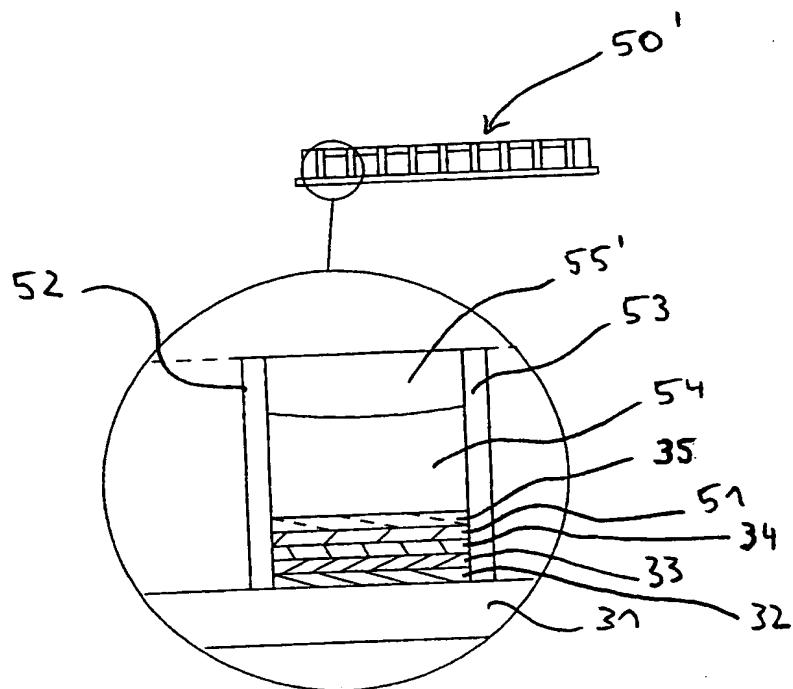


Fig. 5b

6/11

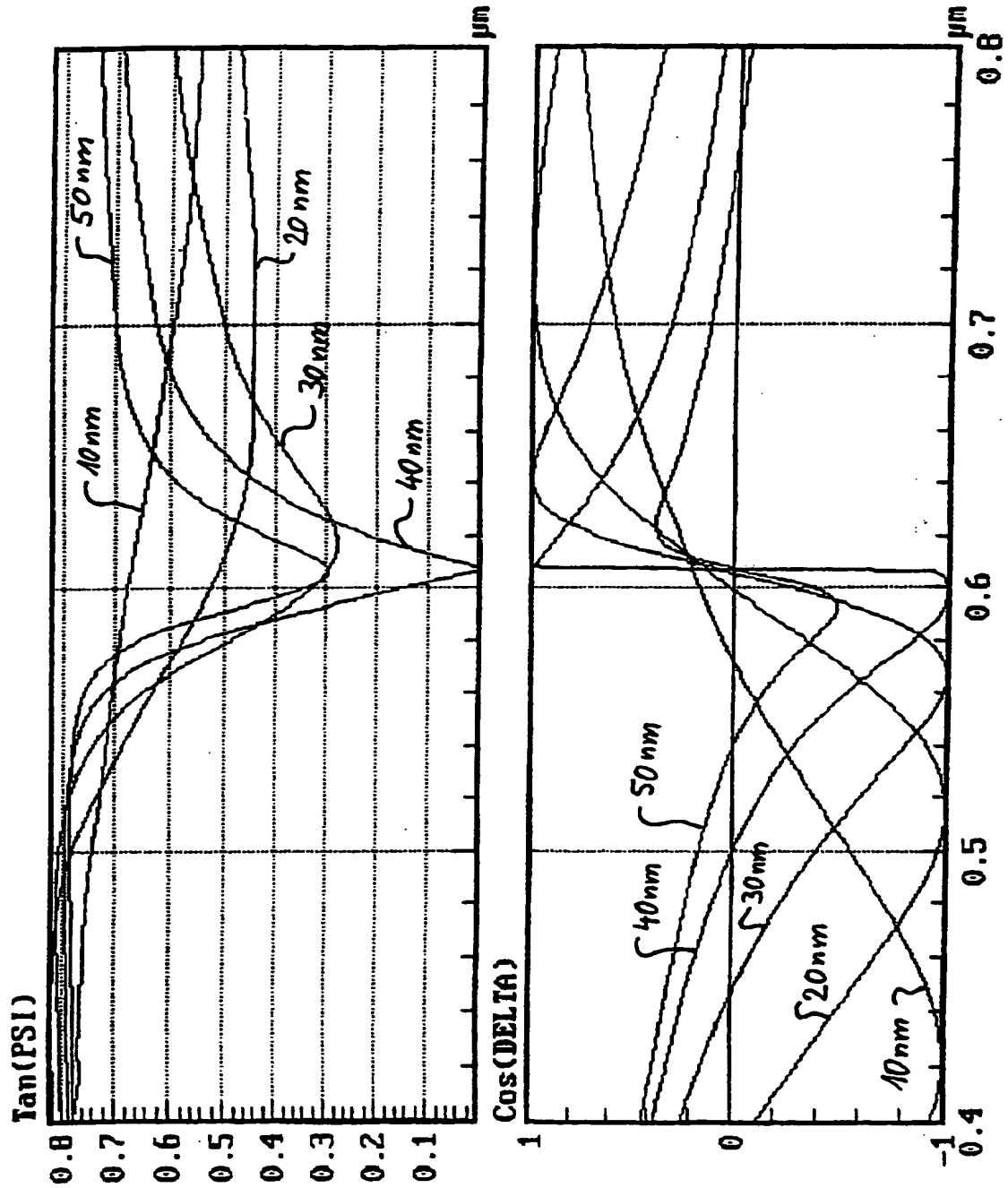


Fig. 6

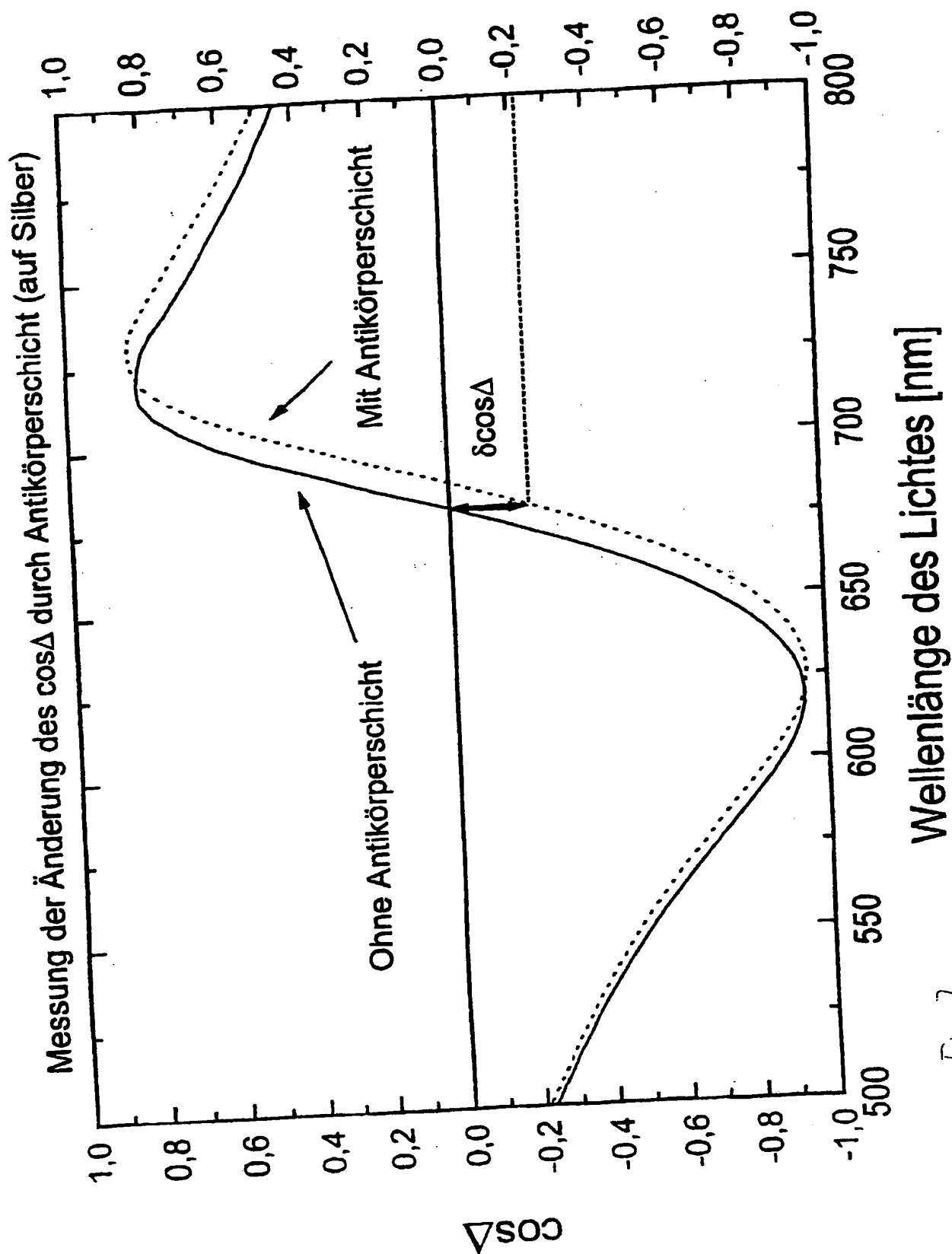


Fig. 7

8/11

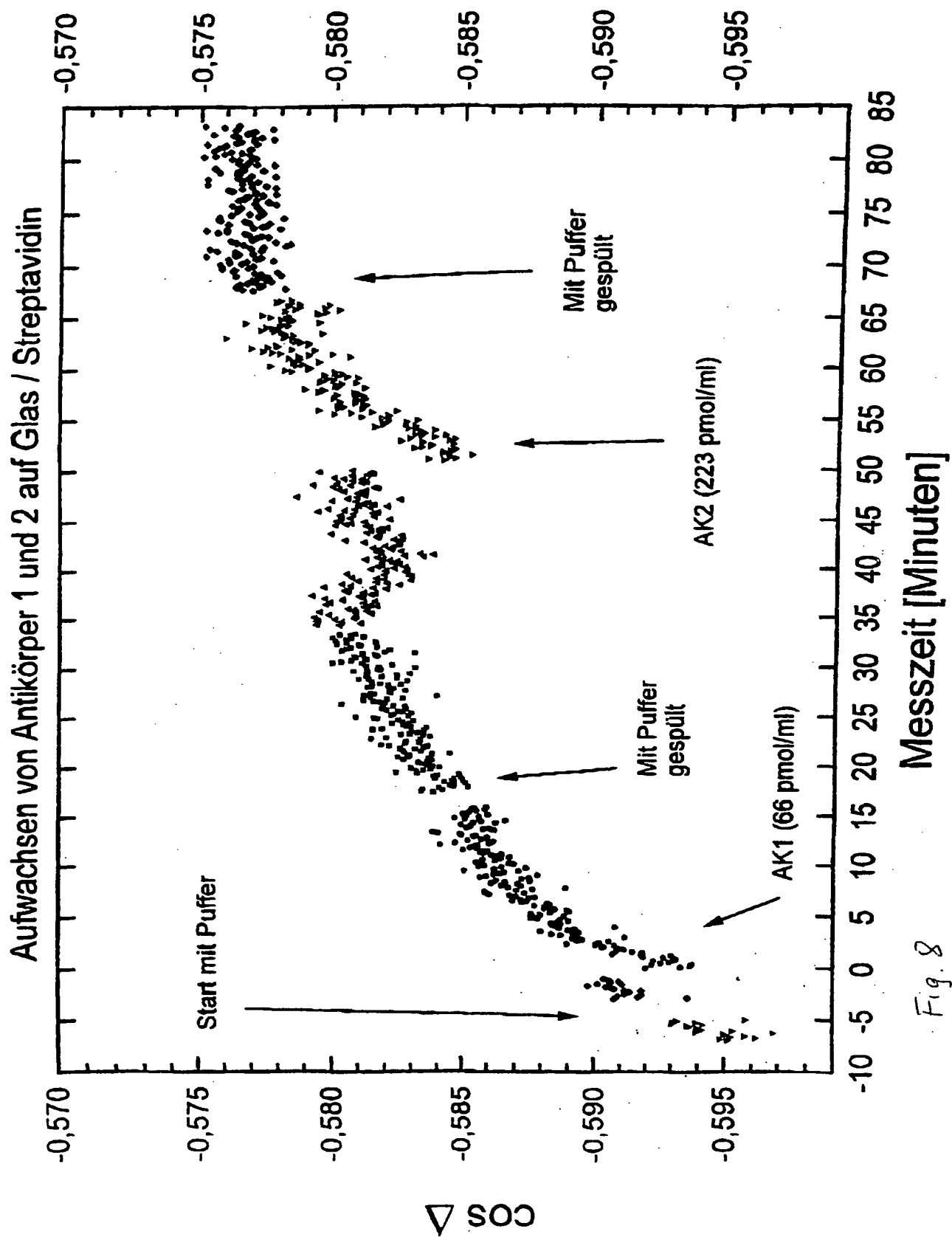


Fig. 8

9/11

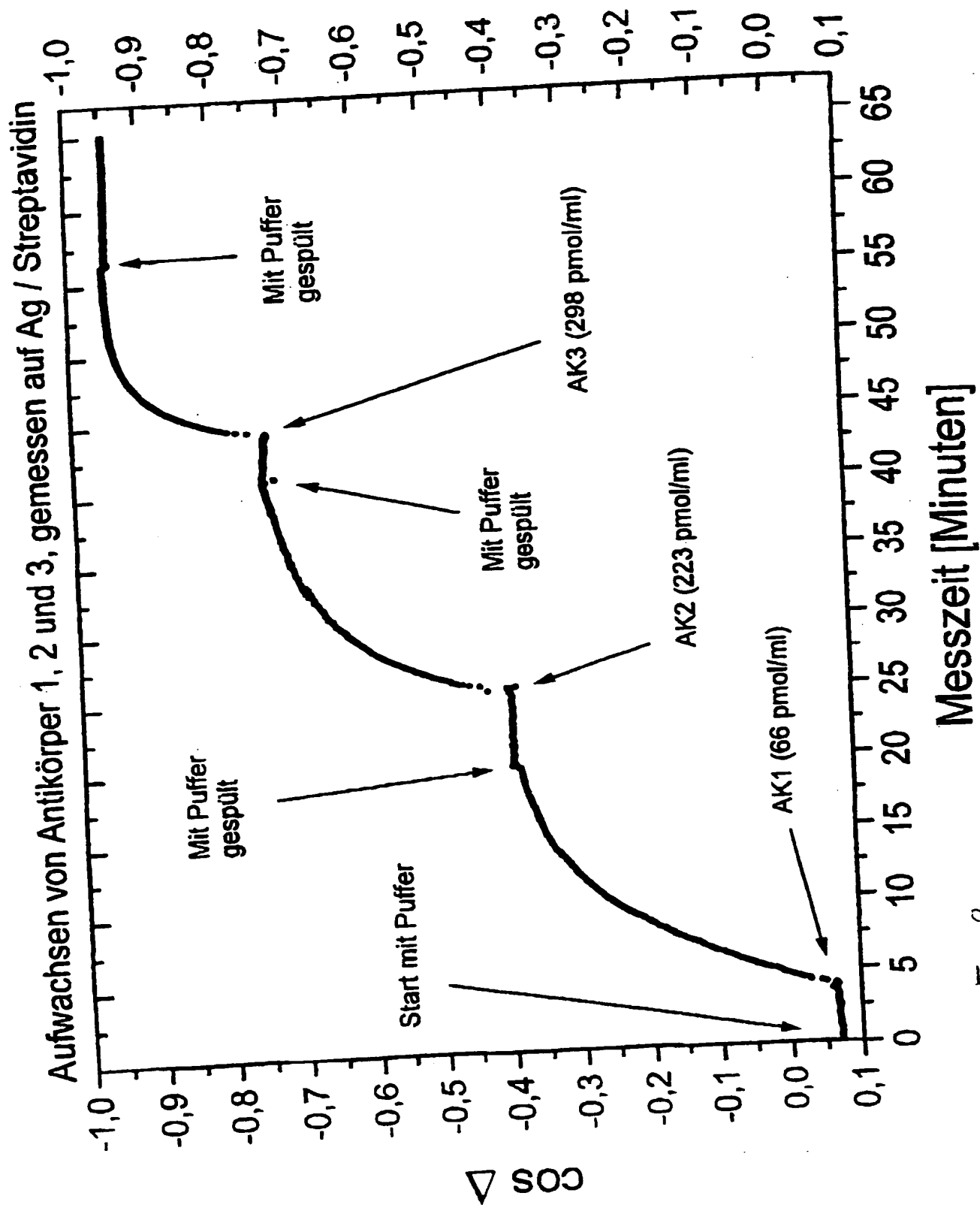


Fig. 9

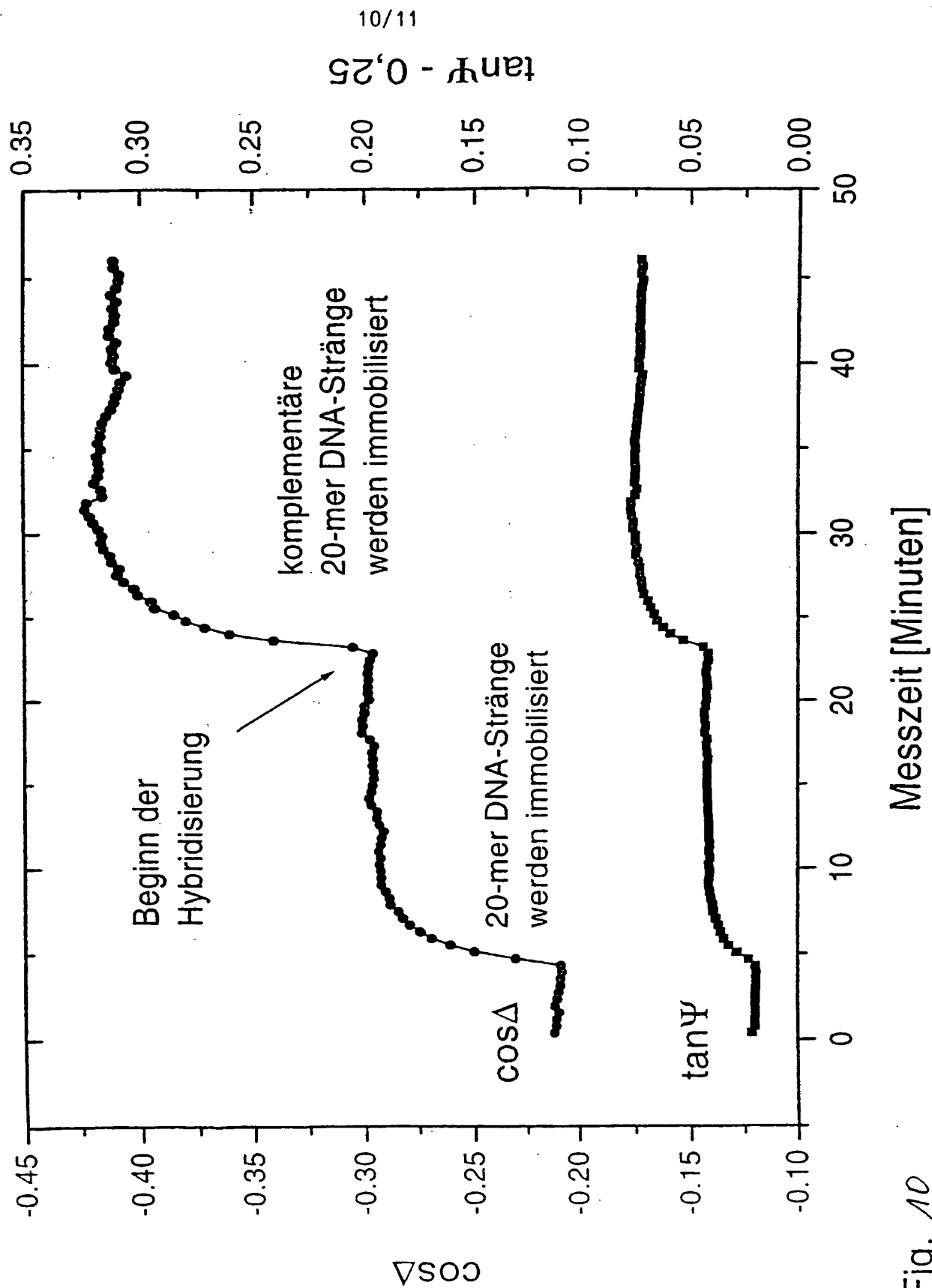


Fig. 10

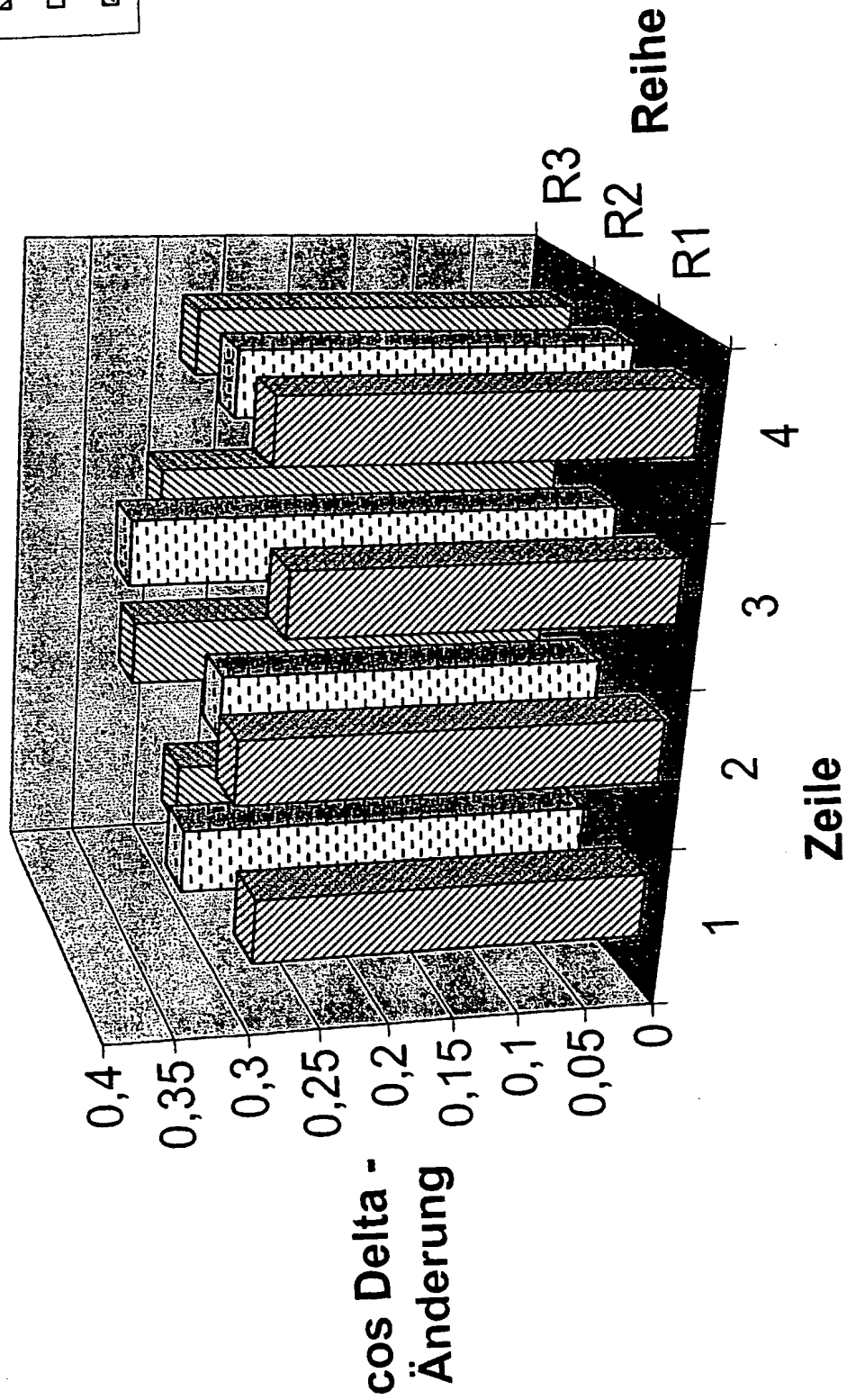
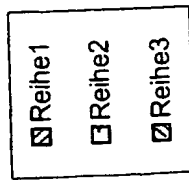


Fig. 11

This Page Blank (uspto)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/097405 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 21/55**,  
21/21

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/05895**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Mai 2002 (29.05.2002)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
101 26 152.7 30. Mai 2001 (30.05.2001) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ  
GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, 55129 Mainz  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WESTPHAL, Peter**

[DE/DE]; Kritzegeben 6, 07743 Jena (DE). **EBER-  
HARDT, Matthias** [DE/DE]; Kelternweg 183, 89075  
Ulm (DE).

(74) Anwalt: **FUCHS MEHLER WEIß & FRITZSCHE**;  
Söhnleinstraße 8, 65201 Wiesbaden (DE).

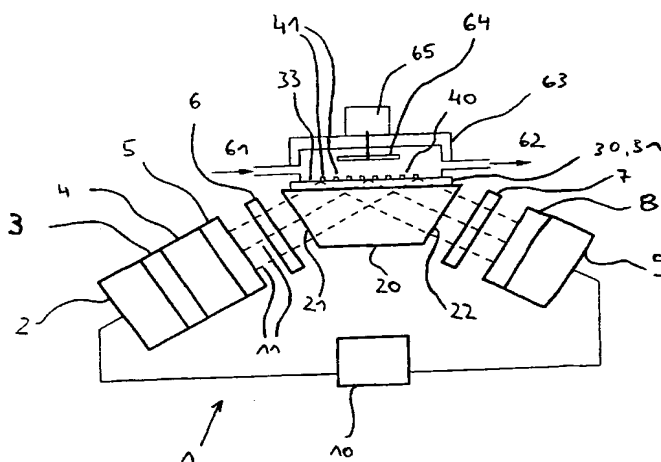
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **HIGH-RESOLUTION ELLIPSOMETRY METHOD FOR QUANTITATIVE OR QUALITATIVE ANALYSIS OF  
SAMPLE VARIATIONS, BIOCHIP AND MEASURING DEVICE**

(54) Bezeichnung: **ORTSAUFGEÖSTES ELLIPSOMETRIE-VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN UND/ODER QUALITA-  
TIVEN BESTIMMUNG VON PROBENÄNDERUNGEN, BIOCHIP UND MESSANORDNUNG**



(57) Abstract: This invention relates to a high-resolution ellipsometry method for quantitative and/or qualitative analysis of sample variations. The sample is located on a sample carrier, equipped with at least one metal film. The parameters  $\Psi$  and  $\Delta$  are determined by ellipsometric measurement, wherein the angle of incidence and/or frequency of the electromagnetic radiation used in ellipsometric measurements is set in such a way as to produce a damped surface plasmon resonance. The detection sensitivity (sample variation unit) is adjusted by means of the thickness of the metal layer. The electromagnetic radiation is planely radiated onto the side of the sample carrier opposite the sample. Using at least one angle of incidence and one frequency at least two staggered, simultaneous high-resolution ellipsometric measurements are taken of the sample or samples. At least the corresponding  $\Delta$  or  $\cos \Delta$  value are evaluated to determine sample variation.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/097405 A3



ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:

20. November 2003

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Es wird ein orts aufgelöstes Ellipsometrieverfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Probenänderungen beschrieben. Die Probe befindet sich auf einem mit mindestens einer Metallschicht versehenen Probenträger. Mittels der ellipsometrischen Messung werden die Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  ermittelt, wobei der Einfallswinkel und/oder die Frequenz der für die ellipsometrischen Messungen verwendeten elektromagnetischen Strahlung derart eingestellt wird, dass in der Metallschicht eine gedämpfte Oberflächenplasmonenresonanz angeregt wird. Die Detektionsempfindlichkeit ( $\delta \cos \Delta$ ) (Einheit der Probenänderung) wird über die Dicke der Metallschicht eingestellt. Die elektromagnetische Strahlung wird auf der der Probe abgewandten Seite des Probenträgers flächig eingestrahlt und bei mindestens einem Einfallswinkel und mindestens einer Frequenz werden mindestens zwei zeitlich versetzte, simultane, orts aufgelöste ellipsometrische Messungen an der Probe/den Proben durchgeführt und wenigstens die jeweils dazugehörigen  $\Delta$  bzw.  $\cos \Delta$ -Werte zur Ermittlung der Probenänderung ausgewertet.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internation  
PCT/EP 02/05895A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N21/55 G01N21/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ° Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.

A	BORTCHAGOVSKY E G: "POSSIBILITIES OF ELLIPSOMETRY WITH THE SURFACE PLASMON EXCITATION IN THE INVESTIGATION OF THIN FILMS IN COMPARISON WITH SEPARATED ELLIPSOMETRY AND SURFACE PLASMON SPECTROSCOPY" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, vol. 3094, 1997, pages 239-249, XP001017834 abstract page 243, paragraph 2 - last line page 247, last paragraph --- -/--	1
---	--	---

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2002

Date of mailing of the international search report

05/02/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Verdoodt, E

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BORKOVSKAYA O Y ET AL: "Characterization of thin metal films with overlayers by transparency and multiangle including surface plasmon excitation reflectance ellipsometry method"</p> <p>POLARIMETRY AND ELLIPSOMETRY, KAZIMIERZ DOLNY, POLAND, 20-23 MAY 1996, vol. 3094, pages 250-254, XP008009528</p> <p>Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, 1997, SPIE-Int. Soc. Opt. Eng, USA</p> <p>ISSN: 0277-786X</p> <p>page 250, last paragraph -page 251, paragraph 2</p>	1
A	<p>---</p> <p>F.ABELÈS: "Surface electromagnetic waves ellipsometry"</p> <p>SURFACE SCIENCE, vol. 56, 1976, pages 237-251, XP008009577</p> <p>page 240, line 1 -page 243, line 25</p>	1
A	<p>---</p> <p>SCHILDKRAUT J S: "Limitations to the determination of the optical properties of a thin film by combined ellipsometric and surface plasmon resonance measurements"</p> <p>APPLIED OPTICS, 15 AUG. 1988, USA, vol. 27, no. 16, pages 3329-3333, XP002218620</p> <p>ISSN: 0003-6935</p> <p>page 3331, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 2</p>	11
A	<p>---</p> <p>MEICHSNER J: "IN SITU CHARACTERISATION OF POLYMER SURFACES AND THIN ORGANIC FILMS IN PLASMA PROCESSING"</p> <p>CONTRIBUTIONS TO PLASMA PHYSICS, AKADEMIE VERLAG, BERLIN, DE, vol. 39, no. 5, 1999, pages 427-439, XP001018278</p> <p>ISSN: 0863-1042</p> <p>page 430, paragraph 2 - paragraph 3</p>	28
A	<p>---</p> <p>HARKE M ET AL: "DESCRIPTION OF A SINGLE MODULAR OPTICAL SETUP FOR ELLIPSOMETRY, SURFACE PLASMONS, WAVEGUIDE MODES, AND THEIR CORRESPONDING IMAGING TECHNIQUES INCLUDING BREWSTER ANGLE MICROSCOPY"</p> <p>REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 68, no. 8, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 3130-3134, XP000723525</p> <p>ISSN: 0034-6748</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	28

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic "cation No  
PCT/EP 02/05895

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
A	DE 198 14 811 C (INST PHYSIKALISCHE HOCHTECH EV) 5 August 1999 (1999-08-05) the whole document -----	28

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/05895

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19814811	C	05-08-1999	DE 19814811 C1	05-08-1999
			WO 0022419 A1	20-04-2000
			EP 1068511 A1	17-01-2001
<hr/>				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N21/55 G01N21/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, PAJ, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BORTCHAGOVSKY E G: "POSSIBILITIES OF ELLIPSOMETRY WITH THE SURFACE PLASMON EXCITATION IN THE INVESTIGATION OF THIN FILMS IN COMPARISON WITH SEPARATED ELLIPSOMETRY AND SURFACE PLASMON SPECTROSCOPY" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, Bd. 3094, 1997, Seiten 239-249, XP001017834 Zusammenfassung Seite 243, Absatz 2 - letzte Zeile Seite 247, letzter Absatz --- -/--	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/02/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Verdoodt, E

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BORKOVSKAYA O Y ET AL: "Characterization of thin metal films with overlayers by transparency and multiangle including surface plasmon excitation reflectance ellipsometry method"</p> <p>POLARIMETRY AND ELLIPSOMETRY, KAZIMIERZ DOLNY, POLAND, 20-23 MAY 1996, Bd. 3094, Seiten 250-254, XP008009528</p> <p>Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, 1997, SPIE-Int. Soc. Opt. Eng, USA</p> <p>ISSN: 0277-786X</p> <p>Seite 250, letzter Absatz -Seite 251, Absatz 2</p>	1
A	<p>F.ABELÈS: "Surface electromagnetic waves ellipsometry"</p> <p>SURFACE SCIENCE, Bd. 56, 1976, Seiten 237-251, XP008009577</p> <p>Seite 240, Zeile 1 -Seite 243, Zeile 25</p>	1
A	<p>SCHILDKRAUT J S: "Limitations to the determination of the optical properties of a thin film by combined ellipsometric and surface plasmon resonance measurements"</p> <p>APPLIED OPTICS, 15 AUG. 1988, USA, Bd. 27, Nr. 16, Seiten 3329-3333, XP002218620</p> <p>ISSN: 0003-6935</p> <p>Seite 3331, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 2</p>	11
A	<p>MEICHSNER J: "IN SITU CHARACTERISATION OF POLYMER SURFACES AND THIN ORGANIC FILMS IN PLASMA PROCESSING"</p> <p>CONTRIBUTIONS TO PLASMA PHYSICS, AKADEMIE VERLAG, BERLIN, DE, Bd. 39, Nr. 5, 1999, Seiten 427-439, XP001018278</p> <p>ISSN: 0863-1042</p> <p>Seite 430, Absatz 2 - Absatz 3</p>	28
A	<p>HARKE M ET AL: "DESCRIPTION OF A SINGLE MODULAR OPTICAL SETUP FOR ELLIPSOMETRY, SURFACE PLASMONS, WAVEGUIDE MODES, AND THEIR CORRESPONDING IMAGING TECHNIQUES INCLUDING BREWSTER ANGLE MICROSCOPY"</p> <p>REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, Bd. 68, Nr. 8, 1. August 1997 (1997-08-01), Seiten 3130-3134, XP000723525</p> <p>ISSN: 0034-6748</p> <p>das ganze Dokument</p>	28

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 198 14 811 C (INST PHYSIKALISCHE HOCHTECH EV) 5. August 1999 (1999-08-05) das ganze Dokument -----	28

Angaben zu Veröffentlichungen.

en Patentfamilie gehören

International — zeichen

PCT/EP 02/05895

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19814811 C	05-08-1999	DE 19814811 C1	05-08-1999
		WO 0022419 A1	20-04-2000
		EP 1068511 A1	17-01-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto,